



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Annaïck DESMAISON

Le vendredi 27 juin 2014

Titre :

Impact des contraintes mécaniques sur la division cellulaire : Analyse dans un modèle tumoral multicellulaire en 3 dimensions : le sphéroïde

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie cellulaire

Unité de recherche :

USR3505

Directeur(s) de Thèse :

DUCOMMUN Bernard, Professeur des Universités, Toulouse
LOBJOIS Valérie, Maître de Conférence, Toulouse

Rapporteurs :

FILHOL-COCHET Odile, Chargée de Recherche, Grenoble
THERY Manuel, Chef d'Equipe, Paris

Autre(s) membre(s) du jury :

Président du Jury : CHAP Hugues, Professeur des Universités, Toulouse
Examineur : DELATTRE Olivier, Directeur de Recherche, Paris



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :
Annaïck DESMAISON

Le vendredi 27 juin 2014

Titre :

Impact des contraintes mécaniques sur la division cellulaire : Analyse dans un modèle tumoral multicellulaire en 3 dimensions : le sphéroïde

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie cellulaire

Unité de recherche :

USR3505

Directeur(s) de Thèse :

DUCOMMUN Bernard, Professeur des Universités, Toulouse
LOBJOIS Valérie, Maître de Conférence, Toulouse

Rapporteurs :

FILHOL-COCHET Odile, Chargée de Recherche, Grenoble
THERY Manuel, Chef d'Equipe, Paris

Autre(s) membre(s) du jury :

Président du Jury : CHAP Hugues, Professeur des Universités, Toulouse
Examineur : DELATTRE Olivier, Directeur de Recherche, Paris

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier Madame Odile Filhol-Cochet, Messieurs Olivier Delattre et Manuel Théry, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de lire et de discuter de mes travaux. Je remercie sincèrement le Professeur Hugues Chap, pour m'avoir convaincue de me lancer dans ce double cursus médecine-biologie, puis pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Valérie et Bernard, j'ai passé quatre années excellentes grâce à vous. Je vous remercie pour la confiance que vous avez eu en moi, mais également pour votre accompagnement enrichissant au-delà de mes espérances. Je pense que nous avons formé un trio pas seulement fonctionnel, mais aussi auquel il était agréable d'appartenir. Le climat professionnel et amical qui s'est établi entre nous a pour beaucoup participé à mon épanouissement au sein de l'équipe ; a, à chaque instant, renforcé ma conviction d'avoir fait le bon choix ; et a ancré plus profondément ma passion pour la recherche. Je vous remercie de tout cœur, et je souhaite que nos chemins se croisent encore de nombreuses fois.

Gwen, nous n'avons pas seulement été collègues, mais également colocataires. Nous avons partagé nos joies, nos espoirs, nos coups durs. J'ai gagné une amie. Parce que le SPIM ne sera jamais correctement aligné, tu resteras un véritable pilier de ma vie de thésarde.

S'il est si facile de se sentir bien au laboratoire, c'est aussi parce que l'équipe qui m'est chère, l'équipe IP3D, est une équipe dans laquelle chacun fait attention et s'intéresse à l'autre. Je vous remercie tous, pour votre aide systématique et pour votre sympathie. Il y a d'abord les « anciens », qui étaient là à mes débuts. Merci à vous, Annie, Céline, Corinne, Denis, Martine et Odile pour m'avoir intégrée dans l'équipe et jusqu'à la fin enseigné vos savoirs. Je remercie également celles et ceux qui ont partagé avec moi un bout de chemin et de nombreux fous-rires (qui portent loin) : Aurélie, Claire, Gwen, Jenny, Marine, Olivia, Paul, Raf, Sarah, Steph et Thomas. Les plus proches le savent, c'est en faisant des bisous aux sphéroïdes et au SPIM qu'ils ont tous bien voulu coopérer avec moi, c'est une méthode certifiée efficace ☺

Je quitte l'équipe sans inquiétude, car il y a encore Aurore, Laure, Laurène et les deux Nathalie pour prendre la relève et faire perdurer cette joyeuse ambiance !

L'ITAV, en tant que laboratoire multidisciplinaire, offre une chance inouïe de pouvoir se sensibiliser, voir se lancer des collaborations avec des chercheurs d'autres domaines. Je souhaite remercier tous ceux avec qui j'ai interagis au cours de ma thèse. Je remercie tout particulièrement Jacques pour son aide en imagerie, et Marie-Laure pour son aide en analyse d'image. Je remercie sincèrement Pierre et Wenxing pour la collaboration en analyse d'image. Je remercie Dominique Bourgeois pour avoir fait le pari que la génétique se révélerait dans mes sphéroïdes. Je remercie Katia Grenier pour son apport dans le domaine des nanotechnologies.

Je remercie également mes proches, amis et famille, qui se sont toujours intéressés à mon travail et avec qui j'ai pu partager les beaux comme dans les mauvais moments.

J'ai été trop bavarde, mais nous avons trop peu d'occasions d'être reconnaissant, ce que je suis envers tous ceux qui m'ont permis et m'ont accompagné de près ou de loin, dans ce double cursus. Ainsi pour finir, je remercie, l'ARC, l'université de Toulouse, l'Ecole de l'Inserm et la fondation Bettencourt-Schueller pour l'immense chance de pouvoir faire de la recherche qu'ils m'ont offerte.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

TABLE DES FIGURES	15
PREAMBULE.....	21
INTRODUCTION	23
1) Les limites thérapeutiques actuelles des traitements anticancéreux.....	25
a) La résistance aux traitements	27
b) Prise en compte du microenvironnement tumoral en thérapie antitumorale	29
2) Les propriétés mécaniques du microenvironnement contribuent au développement tumoral.....	31
a) Les propriétés mécaniques du microenvironnement sont modifiées au cours de la croissance tumorale	33
b) Les modifications des propriétés mécaniques du microenvironnement sont impliquées dans chacune des étapes du développement tumoral	37
i. Transitions phénotypiques	37
ii. Effets sur la prolifération et la survie cellulaire	39
iii. Effets sur la structure et la mobilité des cellules.....	43
3) Les acteurs moléculaires de la réponse mécanique	46
a) Les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire dépendent de sa composition moléculaire.	46
b) Implication des jonctions cellules-matrice et cellules-cellules dans la mécanotransduction.....	48
c) Le cytosquelette d'actomyosine est un acteur structurel de la mécanotransduction .	51
d) La mécanotransduction jusqu'au noyau	55
i. Par une connexion physique de l'actine à la chromatine.....	55
ii. Par des facteurs nucléaires ou de transcription	57
e) La perte de la mécanoréciprocité et le développement tumoral.....	59
4) La division cellulaire.....	61
a) Présentation générale du cycle cellulaire	61

i.	Les différentes phases du cycle cellulaire.....	61
ii.	La progression dans le cycle cellulaire est contrôlée.....	63
iii.	La duplication des centrosomes	63
b)	La mitose	65
i.	De la prophase à la pro-métaphase.....	65
ii.	La métaphase et le point de contrôle mitotique	67
iii.	L'orientation de l'axe de division	69
iv.	De l'anaphase à la cytokinèse	73
5)	Les contraintes mécaniques ont un rôle dans le contrôle de la mitose.....	74
a)	Impact des contraintes mécaniques sur la progression en mitose.....	74
b)	Impact des contraintes mécaniques sur la détermination de l'axe de division	74
c)	Défaut de positionnement de l'axe de division et développement tumoral.....	80
i.	Implication d'un défaut d'orientation de l'axe de division dans l'initiation tumorale.....	80
ii.	Les défauts d'orientation de l'axe de division sont des facteurs pouvant contribuer au développement tumoral	81
6)	Intérêts du modèle du sphéroïde pour l'étude de la biologie des cellules tumorales .	83
a)	Le modèle du sphéroïde mime in vitro l'organisation d'une micro-tumeur	83
i.	La mise en place des gradients d'oxygène, de nutriments et de prolifération au cours de la croissance des sphéroïdes.....	83
ii.	Le modèle sphéroïde reproduit les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire	84
iii.	Le modèle du sphéroïde est un modèle de choix pour les études pharmacologiques.....	85
b)	Imagerie du sphéroïde par Microscopie à feuille de lumière	89
c)	Le modèle du sphéroïde est adapté à l'étude de l'impact des propriétés mécaniques sur le comportement des cellules tumorales	91
i.	Techniques de mesure des propriétés mécaniques et des forces existantes au sein des sphéroïdes.....	91
ii.	Etudes de l'impact des contraintes mécanique sur la croissance des sphéroïdes	95

RESULTATS.....	97
PARTIE 1 : ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR LA PROGRESSION EN MITOSE DANS LE MODELE DU SPHEROÏDE	99
1) Résultats.....	99
2) Article	101
3) Résultats complémentaires.....	113
a) Analyse de la tension des sphéroïdes contraints.....	113
b) Analyse des gradients des sphéroïdes libérés des dispositifs.....	115
c) Analyse de l'impact des contraintes mécaniques sur l'hétérogénéité génétique au sein des sphéroïdes.....	115
i. Analyse de la polyploïdie	115
ii. Analyse de l'aneuploïdie	117
4) Discussion.....	119
a) Les microdispositifs en PDMS sont adaptés à la croissance des sphéroïdes.....	119
b) La croissance des sphéroïdes entre les murs de PDMS contraint mécaniquement les sphéroïdes	119
c) La croissance sous contrainte mécanique modifie le gradient de prolifération	120
d) La contrainte mécanique empêche la progression en mitose.....	122
PARTIE 2 : ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR LE DEROULEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROIDES	125
1) Analyse de la dynamique de progression en mitose dans les sphéroïdes contrôles...125	
a) Détermination des différentes étapes de la mitose, en 3D et en temps réel, au sein des sphéroïdes.....	125
b) Analyse de la durée des phases de la mitose dans les sphéroïdes contrôles.....	127
2) Analyse de la dynamique de progression en mitose dans les sphéroïdes contraints .128	
a) Caractérisation des sphéroïdes placés sous contrainte isotrope en agarose.....	128

b) Analyse de la durée des phases de la mitose dans les sphéroïdes contraints.....	130
3) Discussion.....	132
a) Une organisation des chromosomes en rosace est visible dans les cellules mitotiques des sphéroïdes contraints	132
b) La contrainte mécanique induit un délai de progression en prométaphase.....	133
i. Défaut de duplication des centrosomes.....	133
ii. Défauts de dynamique des microtubules.....	133
iii. Défaut de dynamique du cytosquelette d'actomyosine	136

PARTIE 3 : ETUDE DE L'IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTOMYOSINE DANS LE DEROULEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROÏDES139

1) Analyse de l'impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur l'organisation de l'actine au sein des sphéroïdes	139
a) Inhibition de la contractilité des filaments d'actine par la Blebbistatine	139
b) Déstabilisation de la dynamique d'assemblage des filaments d'actine par la Latrunculine A.....	143
2) Analyse de l'implication du cytosquelette d'actomyosine sur la durée des étapes de la mitose dans les sphéroïdes contraints	143
3) Analyse de l'implication du cytosquelette d'actomyosine dans le déroulement des mitoses dans les sphéroïdes contrôles	144
a) Analyse de la durée des étapes de la mitose	145
b) Analyse du rapport des durées entre conditions contrainte et contrôle	147
4) Discussion.....	149

PARTIE 4 : ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR L'ORIENTATION DE L'AXE DE DIVISION DES MITOSES AU SEIN DES SPHEROÏDES153

1) Analyse de l'orientation de l'axe de division des cellules dans les sphéroïdes contrôles et contraints.	153
--	------------

2) Analyse du rôle du cytosquelette d'actomyosine dans la détermination de l'orientation de l'axe de division des cellules	159
a) Analyse de l'orientation de l'axe de division	159
b) Analyse de l'oscillation de la plaque métaphasique	161
3) Discussion	162

PARTIE 5 : ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANQUES SUR L'ACHEVEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROIDES

1) Analyse de la fidélité des divisions	165
2) Discussion	168
a) Les divisions anormales résultent de l'inhibition de la cytokinèse par les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine	168
b) Arguments soutenant l'existence d'un processus de cytokinèse dans les sphéroïdes contraints traités	169
i. Les autres modes de cytokinèse dans le monde vivant.....	169
ii. Mécanismes de cytokinèse partiellement indépendant du cytosquelette d'actomyosine.....	171
iii. Protection partielle de l'action des traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine par la contrainte mécanique	175
c) Arguments soutenant une fusion des noyaux et un regroupement des centrosomes surnuméraires sous l'effet des contraintes mécaniques	178
d) Arguments soutenant un contrôle de la progression dans le cycle, activé dans les sphéroïdes contraints	180
i. « Tetraploid checkpoint »	180
ii. Arrêt en G1 suite à un délai en prométaphase.....	181

PARTIE 6 : ETUDE DE L'IMPACT DE LA CONTRAINTE MECANIQUE SUR LES TENSIONS ET L'ORGANISATION CELLULAIRE AU SEIN DES SPHEROIDES.....

1) Analyse de l'impact des contraintes mécaniques sur la tension de surface des sphéroïdes	183
---	------------

2) Analyse de l'impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur la tension de surface des sphéroïdes	187
3) Analyse de la topologie tissulaire des sphéroïdes	189
a) Analyse de la distribution des jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes.....	189
b) Analyse de l'organisation des noyaux au sein des sphéroïdes	189
4) Discussion.....	192
a) La contrainte mécanique augmente la cohésion cellulaire sans modifier l'organisation cellulaire au sein des sphéroïdes.....	192
b) La contrainte mécanique modifie l'effet des inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine sur les forces et l'organisation cellulaire des sphéroïdes...	193
 DISCUSSION GENERALE ET PERPECTIVES.....	 197
1) Régulation de la progression en mitose et de la réponse aux traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine dans les sphéroïdes contraints mécaniquement	199
2) Impact du microenvironnement tumoral sur le développement tumoral.....	201
a) Devenir des cellules ayant un défaut de progression en mitose	201
b) Impact des contraintes mécaniques sur l'hétérogénéité génétique des cellules au sein des sphéroïdes.....	202
c) Impact sur l'évolution de la maladie	204
i. Augmentation de la survie et des mécanismes de défense des cellules tumorales .	204
ii. Participation des contraintes mécaniques au développement des capacités invasives des cellules	205
iii. Augmentation de la désorganisation tissulaire	206
3) Enjeux pour la thérapie anticancéreuse	206
a) Résistance aux traitements et récurrence du cancer	206
b) Identification de nouvelles cibles des agents anticancéreux.....	208

MATERIELS ET METHODES	209
1) Culture cellulaire.....	211
a) Culture des cellules	211
b) Obtention des sphéroïdes	211
2) Culture des sphéroïdes contraints entre les murs de PDMS	211
a) Fabrication du dispositif en PDMS :	211
b) Mise sous contrainte	212
3) Culture des sphéroïdes enrobés dans l'agarose 1%	212
4) Marquages des cellules	212
a) Immunofluorescence sur coupes de sphéroïdes	212
b) Détection de l'hypoxie intracellulaire	213
c) Incorporation d'EdU	214
d) Marquage de l'ADN et fin de traitement des lames	214
5) Imagerie et analyse des images en fluorescence de coupes à congélation	214
6) Imagerie et analyse des sphéroïdes en lumière transmise	215
7) Analyses de l'hétérogénéité génétique des cellules	215
a) Cytométrie.....	215
b) Etalement chromosomique.....	216
8) Contrôle de la diffusion de la Blebbistatine à travers les gels.....	217
9) Imagerie des sphéroïdes au SPIM.....	217
a) Montage des échantillons	217
b) Acquisition en 3D et en temps réel	218
10) Détermination des durées des étapes de la mitose des sphéroïdes imagés au SPIM.	218
11) Détermination de l'orientation de l'axe de division des mitoses au sein des sphéroïdes	218
12) Détermination de l'organisation des noyaux au sein des sphéroïdes	220

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223
LEGENDES DES FILMS	243
FIGURES ANNEXES	247
ABREVIATIONS.....	253

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les six caractéristiques essentielles associées au développement de tumeurs	24
Figure 2 : Evolution des nouveaux traitements entre 1993 et 2003 aux Etats-Unis	26
Figure 3 : Etapes conduisant à la résistance aux traitements, à la maladie résiduelle et aux récurrences des cancers	28
Figure 4 : Représentation schématique des différents composants du microenvironnement tumoral	30
Figure 5 : Schéma reflétant la complexité des voies de signalisation induites par le microenvironnement	32
Figure 6 : Augmentation de la rigidité du tissu mammaire avec le développement tumoral	34
Figure 7 : Schéma représentant l'accumulation de stress au sein du tissu tumoral et la perte de mécanoréciprocité des cellules tumorales au cours du développement tumoral	36
Figure 8 : Les tumeurs accumulent des forces au cours de leur croissance, qui peuvent être libérées par incision	38
Figure 9 : Description des microdispositifs adhésifs pour la culture de cellules en monocouche	40
Figure 10 : Les contraintes mécanique impactent la prolifération et l'apoptose au sein des sphéroïdes	42
Figure 11 : Les différents mécanismes de la mécanotransduction	45
Figure 12 : Les jonctions cellules-matrice comme médiateurs de la mécanotransduction	47
Figure 13 : Les jonctions cellules-cellules comme médiateurs de la mécanotransduction	49
Figure 14 : Voie de signalisation induisant la contractilité des filaments d'actine par la myosine II	52
Figure 15 : La mécanotransduction par un lien physique de la membrane plasmique au noyau	54
Figure 16 : La mécanotransduction par les facteurs nucléaire YAP/TAZ	56
Figure 17 : Perte de la mécanoréciprocité dans les tissus tumoraux	58
Figure 18 : Le cycle cellulaire et ses points de contrôle	60
Figure 19 : Les centrosomes et leur duplication	62
Figure 20 : Les étapes de la mitose	64
Figure 21 : Conformation chromosomique en rosace	66
Figure 22 : Le point de contrôle mitotique	68
Figure 23 : La localisation du fuseau mitotique influence le contenu et la localisation des cellules filles	70
Figure 24 : Le processus de la cytokinèse	72
Figure 25 : Rotation du fuseau mitotique d'une cellule manipulée mécaniquement	75
Figure 26 : Contrôle de l'orientation de l'axe de division des cellules par la répartition des jonctions d'adhésion	77
Figure 27 : Contrôle de l'orientation de l'axe de division des cellules par les contraintes tissulaires	78
Figure 28 : Le modèle du sphéroïde	82
Figure 29 : L'architecture tissulaire participe à la révélation des phénotypes cellulaires	86
Figure 30 : La microscopie à feuille de lumière	88
Figure 31 : Méthode de mesure des propriétés mécaniques des cellules par aspiration avec micropipette	90
Figure 32 : Méthode de mesure des propriétés mécaniques des sphéroïdes par compression	92

Figure 33 : Méthode de mesure des forces exercées par les sphéroïdes sur le gel par pistage de billes fluorescentes	93
Figure 34 : Sphéroïdes mécaniquement contraints dans de l'agarose	94
Figure 35 : Mesure des forces au sein des sphéroïdes par incision	112
Figure 36 : Analyse des sphéroïdes libérés des dispositifs	114
Figure 37 : Analyse de l'effet de la contrainte mécanique sur le taux de cellules polyploïdes au sein des sphéroïdes	116
Figure 38 : Analyse de l'effet de la contrainte mécanique sur le taux de cellules polyploïdes au sein des sphéroïdes	118
Figure 39 : Durée des étapes de la mitose des cellules des sphéroïdes contrôles	126
Figure 40 : Caractéristiques de la croissance des sphéroïdes dans un gel d'agarose	129
Figure 41 : Durée des étapes de la mitose de cellules de sphéroïdes contraints dans de l'agarose	131
Figure 42 : Modèle cellulaire du déroulement de la mitose dans les cellules des sphéroïdes	138
Figure 43 : Impact des traitements sur l'organisation des filaments d'actine	140
Figure 44 : Impact des traitements sur la durée des étapes de la mitose de cellules de sphéroïdes contraints dans de l'agarose	142
Figure 45 : Comparaison des effets de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur le déroulement des mitoses entre les sphéroïdes contrôles et les sphéroïdes contraints	146
Figure 46 : Détermination de l'axe de division des mitoses au sein des sphéroïdes	152
Figure 47 : Détermination de l'enveloppe des sphéroïdes par le script Matlab	154
Figure 48 : Orientation de l'axe de division des mitoses des sphéroïdes contrôles	156
Figure 49 : Orientation de l'axe de division des mitoses des sphéroïdes contraints	157
Figure 50 : Impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur l'orientation de l'axe de division des cellules au sein des sphéroïdes	158
Figure 51 : Etude de l'oscillation de la plaque métaphasique des mitoses des sphéroïdes	160
Figure 52 : Impact des traitements sur le déroulement de la mitose de cellules de sphéroïdes contrôles	166
Figure 53 : Comparaison des effets de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur la fidélité des divisions entre les sphéroïdes contrôles et les sphéroïdes contraints	167
Figure 54 : La cytokinèse chez les animaux, les plantes, et les levures	170
Figure 55 : Coordination entre les cellules pour l'achèvement de la cytokinèse dans un épithélium	174
Figure 56 : La contrainte mécanique semble partiellement protéger l'organisation des filaments d'actine contre les traitements	176
Figure 57 : Impact de la contrainte mécanique et des traitements sur la tension de surface des sphéroïdes	182
Figure 58 : Effet de la contrainte mécanique sur la localisation de YAP dans les cellules des sphéroïdes	184
Figure 59 : Impact des traitements sur l'écartement des bords après incision des sphéroïdes	186
Figure 60 : Effets de la contrainte mécanique sur la distribution des jonctions intercellulaires	188
Figure 61 : Impact des contraintes mécaniques et des traitements sur l'organisation des noyaux	190

Figure 62 : Modèle de l'impact des contraintes mécaniques sur la régulation de l'orientation de l'axe de division	194
Figure 63 : Modèle de l'impact des contraintes mécaniques et de l'implication du cytosquelette d'actomyosine dans le déroulement de la mitose dans les sphéroïdes	198
Figure S1 : Arrondissement des cellules mitotiques	249
Figure S2 : Analyse de la diffusion de la Blebbistatine à travers les gels	250
Figure S3 : Durée des étapes de la mitoses pour toutes les conditions de croissance des sphéroïdes	251
Figure S3 : Durée des étapes de la mitoses pour toutes les conditions de croissance des sphéroïdes	252
Film S1	
Film 2	
Film 3	
Film 4	
Film 5	
Film 6	
Film 7	
Film 8	
Film 9	
Film 10	
Film 11	
Film 12	
Film 13	
Film 14	
Film 15	

PREAMBULE

Une tumeur est une structure hautement organisée en 3D, intégrant des relations entre les cellules et avec son environnement. De nombreux travaux montrent aujourd'hui l'importance de l'impact des interactions entre les cellules et leur microenvironnement dans la croissance tumorale et la réponse au traitement. Il a été en particulier montré que la croissance tumorale s'accompagne de l'accumulation d'un stress mécanique qui impacte différents paramètres de la biologie des cellules tumorales. Une des caractéristiques majeure du développement tumoral est la perte du contrôle de la progression du cycle cellulaire participant à la dérégulation de la prolifération. De nombreuses études, effectuée sur des modèles de culture en monocouche, montrent que le déroulement de la division cellulaire, étape clé du cycle cellulaire, est régulée par les propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire.

Dans ce contexte général, mon travail de thèse porte plus précisément sur l'impact des contraintes mécaniques sur la division cellulaire et l'organisation multicellulaire, dans un modèle de microtumeurs *in vitro* : le sphéroïde.

La partie introductive a pour but de décrire le rôle des propriétés mécaniques du microenvironnement dans le développement tumoral et plus précisément dans le contrôle de la prolifération et dans le déroulement de la division cellulaire. Les connaissances actuelles concernant les acteurs de la mécanotransduction, ainsi que le déroulement de la division seront décrites. Le modèle du sphéroïde sera présenté en fin d'introduction.

Dans les six parties suivantes, j'aborderai les résultats obtenus avec deux modèles de sphéroïdes mécaniquement contraints, qui traitent de la mise en place du fuseau mitotique, de son orientation et de l'achèvement de la division. La première partie des résultats a fait l'objet d'une publication dans la revue PloS One. L'implication du cytosquelette d'actomyosine est également présenté dans ces différentes parties. Une discussion détaillée est proposée dans un encart à la fin de chaque partie des résultats.

Le dernier chapitre de ce manuscrit est consacré à une synthèse et une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus et leur potentielle retombée en thérapie anti-tumorale.

INTRODUCTION

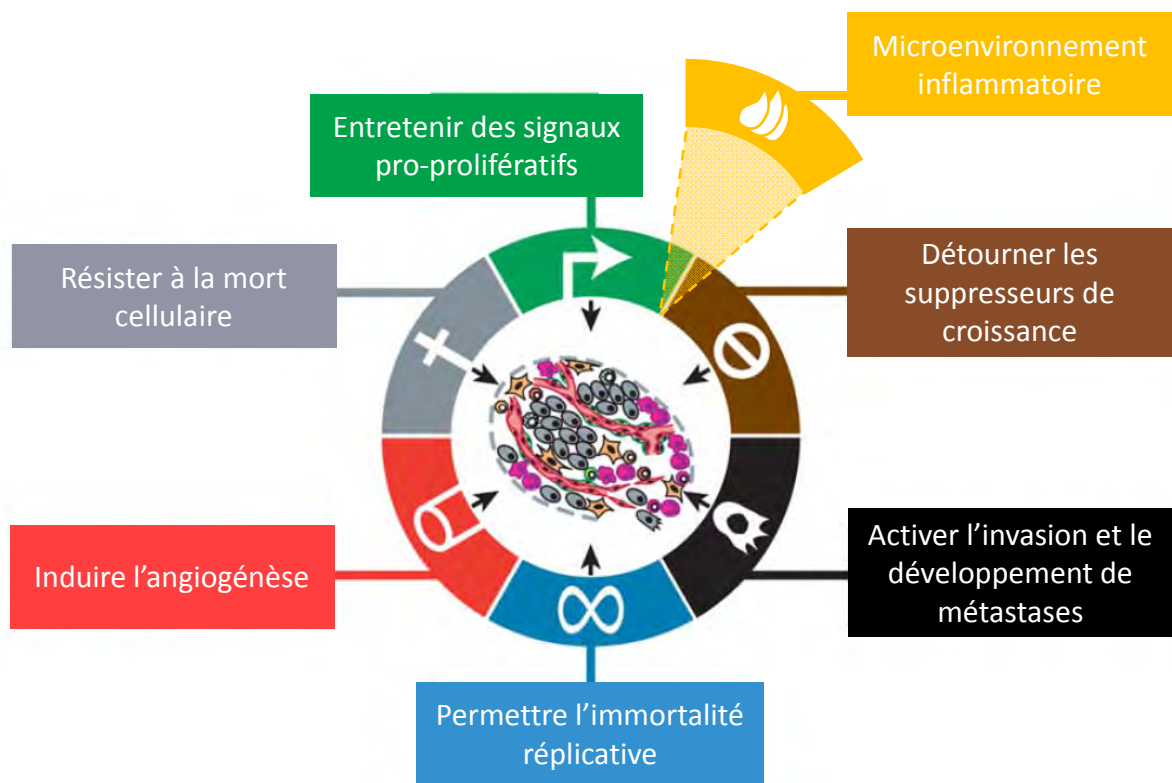


Figure 1 : Les six caractéristiques essentielles associées au développement de tumeurs

Illustration des six caractéristiques clés liées à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique. Le maintien d'une prolifération active provient des capacités à détourner et amplifier les signaux extracellulaires induisant la prolifération, associées à des dérégulations des voies de signalisation inhibant la croissance. Les cellules tumorales développent également des stratégies de contournement de la mort cellulaire. Ces trois capacités doivent être soutenues par la capacité de pouvoir répliquer l'ADN à l'infini afin que les cellules puissent être immortelles et puissent se diviser activement sans entrer en sénescence. L'induction de l'angiogénèse est nécessaire à la création de nouveaux vaisseaux dans la tumeur qui va permettre l'apport de nutriments et d'oxygène et l'évacuation des déchets. Finalement, l'augmentation du grade du cancer et de sa virulence est associée à l'acquisition d'un potentiel invasif et métastatique par les cellules tumorales. Une septième caractéristique a été ajoutée, soulignant l'importance du microenvironnement inflammatoire dans le développement tumoral.

Figure extraite de Hanahan *et al.* (2011) et adaptée d'après Mantovani (2009).

Une des caractéristiques majeures des cellules tumorales est leur capacité à entretenir une prolifération incontrôlée permise par la dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire [1] (**Figure1**). En tant que telle, cette caractéristique est un des fondements du développement tumoral, mais pour bien en comprendre les enjeux, il est nécessaire d'en étudier les paramètres en intégrant la contribution du microenvironnement à la dérégulation du contrôle de la prolifération.

En effet, depuis quelques années, il a été montré et il est maintenant admis que le microenvironnement tumoral joue un rôle capital au cours du développement tumoral, que ce soit par le biais des communications intercellulaires, ou par celui des paramètres biochimiques de la matrice extracellulaire, tels que les facteurs de croissance, les cytokines, l'hypoxie ou la composition protéique du stroma. Parallèlement, de nombreuses études mettent actuellement en évidence l'influence considérable des paramètres mécaniques du microenvironnement sur la progression tumorale. La détection clinique de tumeurs en cherchant les changements de rigidité des tissus par simple palpation, reste l'exemple le plus évident de la modification des paramètres mécaniques du microenvironnement tumoral. Les cellules sont capables de percevoir les propriétés mécaniques de leur environnement, et de s'y adapter par un processus de mécanoréciprocité. Ce processus est cependant dérégulé lors du développement d'une tumeur, contribuant à la progression de la maladie. A cela s'ajoute l'effet délétère de la modification du microenvironnement tumoral sur l'efficacité des traitements. Il apparaît alors indispensable de bien considérer les changements de forces que subissent les cellules tumorales afin de mieux comprendre la nature complexe du développement tumoral. La compréhension des mécanismes impliqués pourrait contribuer à une meilleure classification des tumeurs, à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et au développement de nouvelles stratégies anti-tumorales.

1) Les limites thérapeutiques actuelles des traitements anticancéreux

Malgré de nombreux efforts de recherche à l'échelle mondiale et depuis de nombreuses décennies, le taux de mortalité dû aux cancers reste élevé pour certains types de tumeurs. Le rapport de l'incidence et de la mortalité par les cancers en France entre 1980 et 2012 [2] montre que, tous cancers confondus, le nombre de nouveaux cas a augmenté de 109% et le nombre de décès de seulement 15%. Ces améliorations résultent pour certains cas d'une

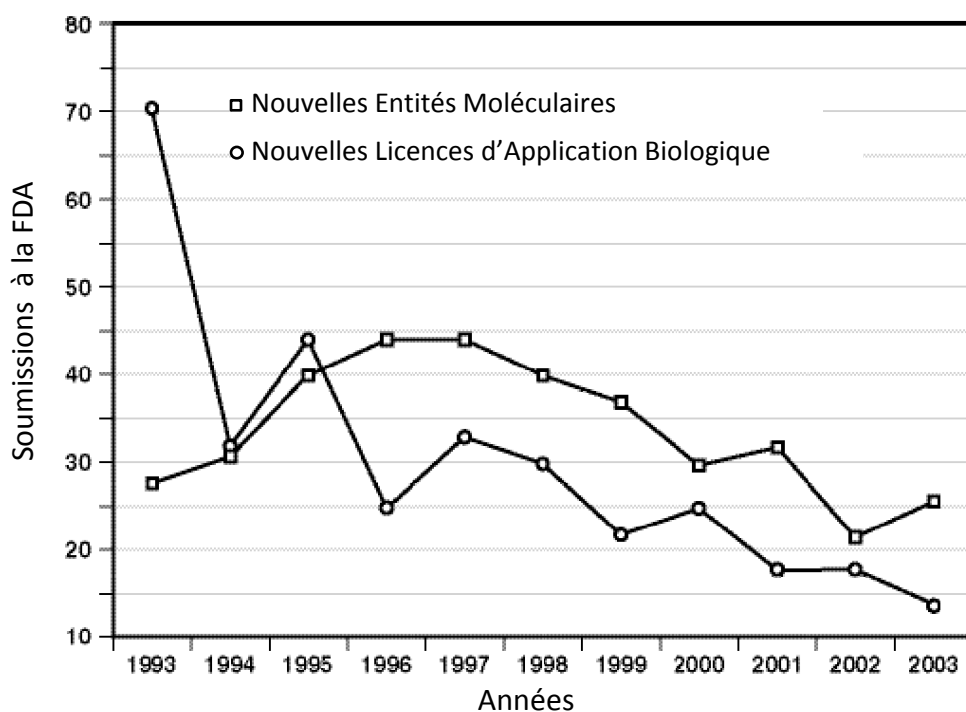


Figure 2 : Evolution des nouveaux traitements entre 1993 et 2003 aux Etats-Unis

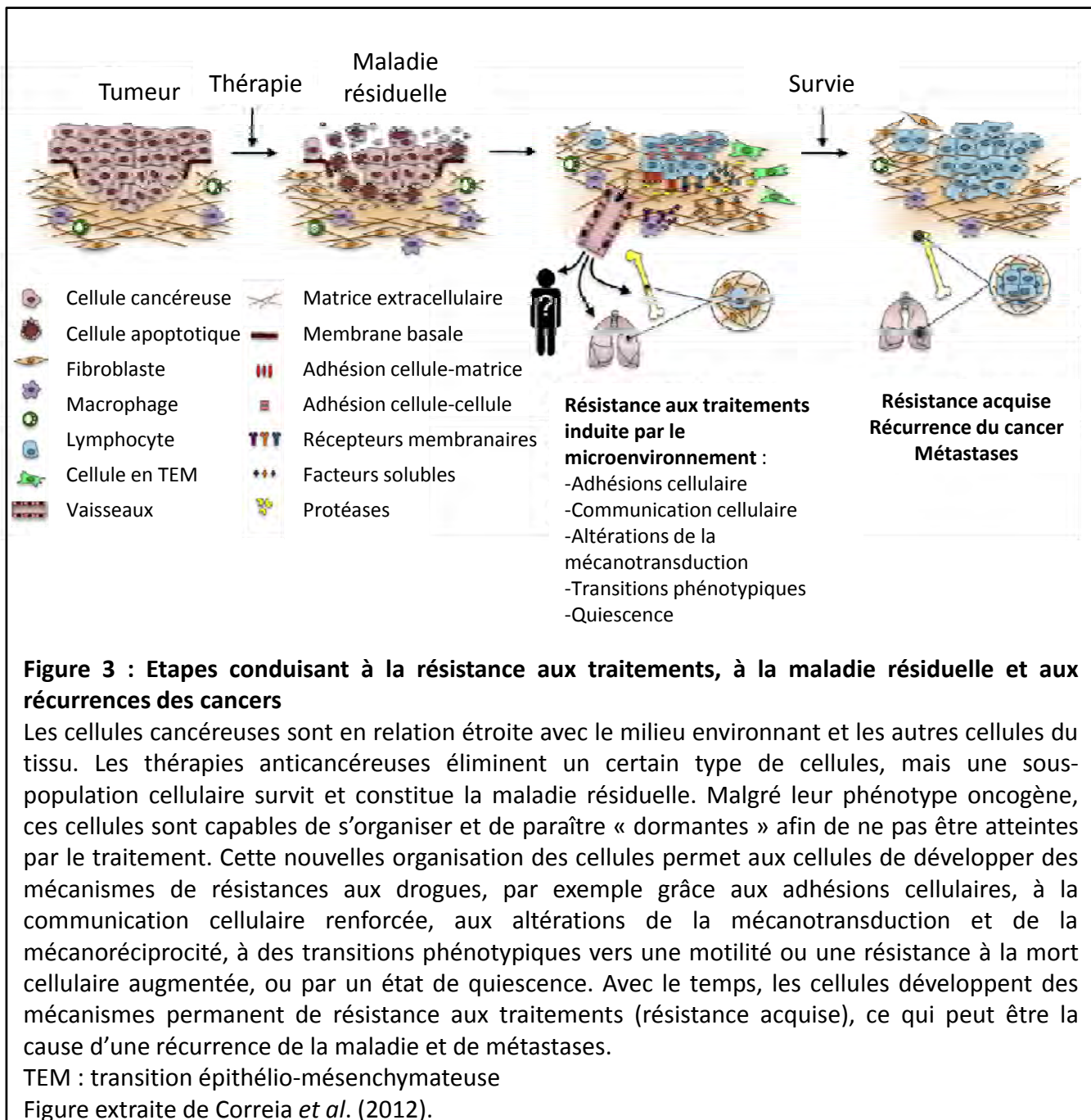
Graphe représentant le nombre de soumissions à la *Food and Drug Administration* (FDA) de nouvelles entités moléculaires (traitement avec une nouvelle structure chimique) et de nouvelles licences d'application biologique (nouvelle indication de traitement pour une molécule déjà existante), entre les années 1993 et 2003.

Figure extraite du rapport de la FDA aux Etats-Unis, *Challenges and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products*, 2004

meilleure détection des cancers, donc d'une augmentation des cas diagnostiqués, alors que le risque de cancer n'augmente pas forcément. De réelles avancées sont faites sur le dépistage, mais le développement des traitements antitumoraux évolue peu. En 2011, seules 7 nouvelles molécules ont été acceptées par la FDA (*Food and Drug Administration*) (**Figure2**), mais une seule, l'Abiratérone acétate, développée pour le cancer de la prostate, possède un réel potentiel de déploiement pour la thérapie antitumorale [3]. Les molécules qui parviennent à l'utilisation en clinique sont souvent des médicaments qui ne seront indiqués que pour une faible population de patients dont la maladie est un peu mieux comprise, ou pour des maladies dont il n'existe quasiment pas de traitement. Dans les deux cas, les aides au développement et à l'approbation rapide de l'utilisation des molécules en thérapie réduisent la nécessité de preuves solides de l'efficacité des drogues [4]. L'autorisation de mise sur le marché de molécules qui n'ont pas été testées par un essai clinique randomisé reste d'actualité [5]. La course aux traitements ne ralentit pas, mais produit peu de molécules effectives pour traiter le cancer [6]. Outre les méthodes de développement des médicaments, l'absence de progrès notables et bénéfiques pour les patients peut s'expliquer par les capacités incroyables d'échappements des cellules tumorales [7].

a) La résistance aux traitements

L'apparition d'une résistance rapide aux traitements par certains patients est une des causes de l'échec des thérapies. Une adaptation rapide des cellules tumorales pourrait expliquer ce phénomène [8]. Les cellules en prolifération au sein d'une tumeur ne représentent qu'une faible proportion des cellules tumorales, la majeure partie de la population étant constituée de cellules quiescentes. La plupart des molécules thérapeutiques anticancéreuses ont pour cible les cellules tumorales en forte prolifération, tandis que les cellules quiescentes, constituant la plus grande partie de la masse tumorale y sont insensibles. Les traitements chimiothérapeutiques éliminent un certain type de cellules appartenant à la tumeur visée, mais une sous-population de cellules dormantes [9], qui a su développer des résistances ou créer un refuge survit à la thérapie. Elles constituent la « maladie résiduelle » [10, 11], et persistent jusqu'à ce qu'elles reçoivent un signal qui les relance dans la course à la croissance tumorale, conduisant à la récurrence de la maladie (**Figure 3**). L'impossibilité de les atteindre est une des causes majeures des échecs thérapeutiques.



Une difficulté de distribution des traitements dans la tumeur augmente la résistance tumorale. Leur faible vasculature [12] limitera les quantités de traitements délivrés, une densité et rigidité élevées ralentiront la diffusion des molécules actives. [13].

Ainsi, il apparaît que l'organisation même de la tumeur participe à la résistance tumorale aux traitements, et à une partie au moins des échecs thérapeutiques. Bien qu'il soit maintenant possible de décrire de manière approfondie les mutations des cellules tumorales et d'utiliser ces informations à des fins thérapeutiques, il est primordial de considérer la tumeur dans toute sa complexité, c'est-à-dire une structure hautement organisée qui se développe en interaction avec son environnement.

b) Prise en compte du microenvironnement tumoral en thérapie antitumorale

Des travaux pionniers, longtemps ignorés, démontraient l'importance capitale du microenvironnement tumoral au cours du développement d'une tumeur au même titre que l'accumulation des altérations génétiques des cellules cancéreuses [14]. Ce n'est que depuis quelques années que la tumeur est reconnue comme un « organe » communiquant avec d'autres entités cellulaires, enrobées dans un tissu que l'on appelle stroma, constituant ainsi le microenvironnement tumoral [15] (**Figure 4**). De manière similaire au développement et à la fonction d'organes, dans lesquels une communication réciproque entre les différents types cellulaires est établie, l'interaction des cellules tumorales avec leur microenvironnement peut largement déterminer le phénotype de la tumeur [16]. Bissell et Hines [17] vont même jusqu'à souligner que si le microenvironnement n'était pas un facteur dominant du contrôle du comportement cellulaire, chaque cellule vivrait indépendamment les unes des autres. Pourtant, la complexité des interactions cellules-cellules et cellules-matrice et des voies de signalisation interdépendantes (**Figure 5**) [1] rend la compréhension de l'impact du microenvironnement sur le développement tumoral imparfaite et imprécise. La force de contrôle des comportements cellulaires que possède le microenvironnement fut mise en évidence par sa capacité à inhiber le phénotype cancéreux de cellules contenant un virus au potentiel oncogénique [18].

Au sein des tissus, un équilibre dynamique existe entre les cellules et leur microenvironnement [7, 17] et dans des conditions d'homéostasie normale, ce dernier exerce une action suppressive pour réprimer la croissance tumorale. Inversement, lorsque

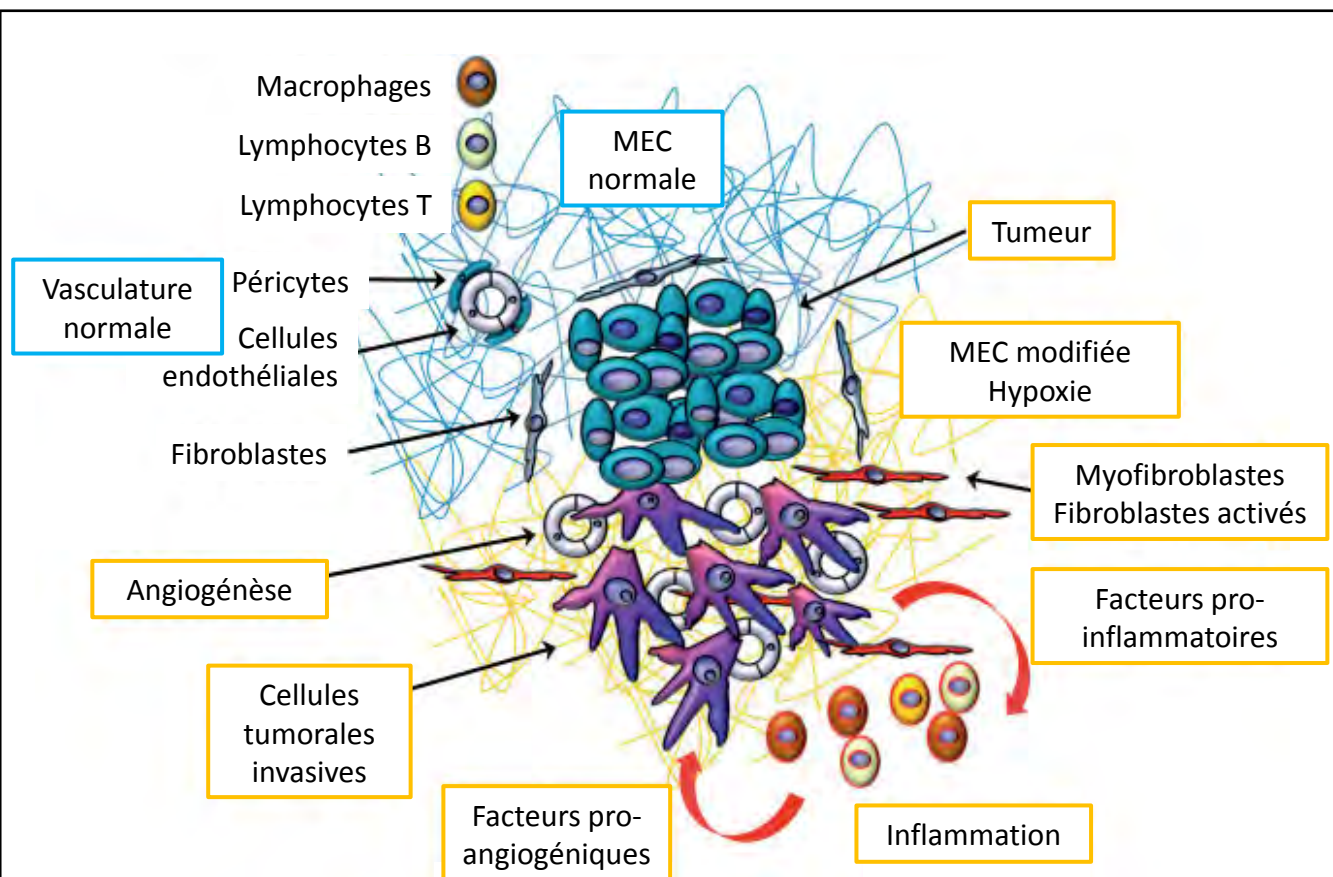


Figure 4 : Représentation schématique des différents composants du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé de différent types cellulaires tels que des fibroblastes activés, des cellules du système immunitaire, des cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins. Les cellules tumorales et les cellules environnantes sécrètent de nombreux facteurs pro-inflammatoires, pro-angiogéniques et pro-invasifs, qui vont modifier la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC) environnante.

Figure extraite de Allen et Jones (2012).

cet équilibre est perturbé ou rompu, le microenvironnement peut favoriser le développement et la progression tumorale [19]. L'activation du stroma par des processus d'inflammation permanents en est l'exemple le plus convaincant [20, 21]. La composition et l'organisation de la matrice extracellulaire participent à la résistance aux traitements, en induisant des gradients de concentration de drogues [22], en augmentant la pression interstitielle [23] et en modifiant l'activité métabolique des cellules cancéreuses [24]. La résistance aux traitements provient également de l'organisation multicellulaire en 3D, et des interactions cellulaires [7]. En effet, moduler l'interaction des cellules avec la matrice-extracellulaire [25], avec les autres types cellulaires ou entre elles influence largement la sensibilité aux traitements [7].

Le remodelage constant du microenvironnement par, et en réponse à la tumeur qui évolue, transforme la thérapie anticancéreuse en une véritable poursuite qui nécessite d'être ajustée continuellement. La compréhension des modifications du microenvironnement au cours du développement tumoral est à élucider pour les empêcher, et maîtriser la tumeur. Le microenvironnement tumoral peut influencer la réponse aux thérapies, son étude chez des patients permettrait une meilleure prédiction de l'efficacité des traitements [26].

Fort de ces connaissances, il devient nécessaire d'intégrer le microenvironnement tumoral dans les études de réponses aux traitements anticancéreux. Des modèles de culture en trois dimensions, qui reproduisent les interactions intercellulaires et les interactions avec la matrice extracellulaire se développent. Les cellules cultivées sous forme de structures qui se rapprochent de leur organe d'origine ont des comportements différents des cellules cultivées en 2D [27, 28]. D'une part, des modèles d'études plus robustes et plus proches de la réalité sont à développer [29, 30] pour mieux évaluer l'efficacité des traitements, d'autre part, la communication entre les cellules tumorales et son microenvironnement, comme son impact sur les comportements cellulaires doivent être plus précisément élucidés.

2) Les propriétés mécaniques du microenvironnement contribuent au développement tumoral

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont montré que les forces générées par, et agissant sur, les tissus influencent le développement tumoral [31, 32]. Chaque tissu possède

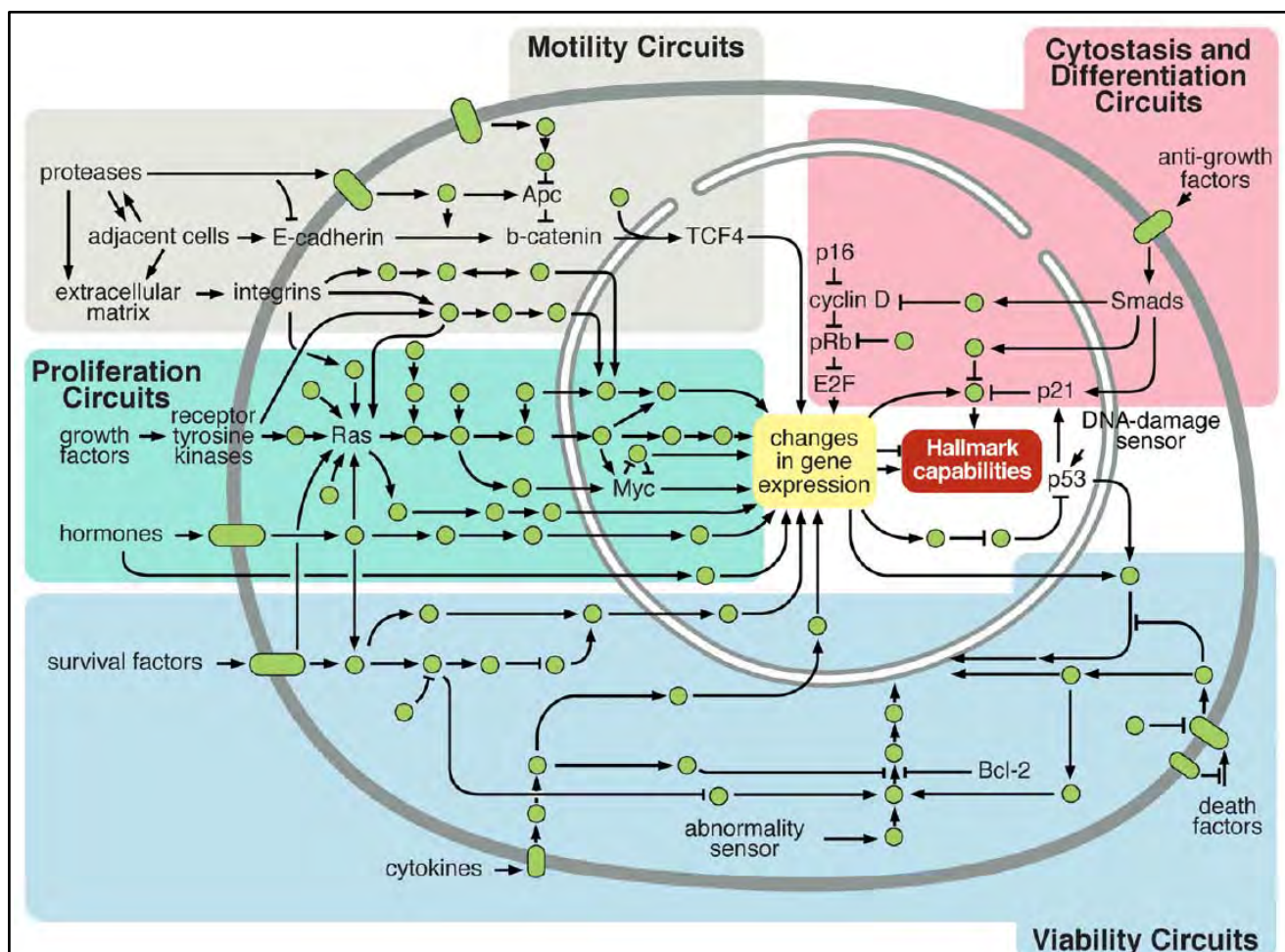


Figure 5 : Schéma reflétant la complexité des voies de signalisation induites par le microenvironnement

Réseau de signalisations intracellulaires interdépendantes activées par le microenvironnement et qui régulent les comportements des cellules cancéreuses. Des sous-circuits régulant certaines capacités cellulaires ont été identifiés et présentés dans des zones colorées différentes : la mobilité cellulaire en gris, la différenciation en rouge, la viabilité en bleu et la prolifération en vert. Ce réseau, bien qu'il représente des interconnexions entre chaque champ d'action des voies de signalisation, est certainement encore plus complexe en réalité.

Figure extraite de Hanahan *et al.* (2011).

des caractéristiques mécaniques spécifiques, et les différents types cellulaires répondent spécifiquement aux propriétés mécaniques des tissus dans lesquels elles résident. Les modifications du microenvironnement associées au développement tumoral induisent des modifications de ses propriétés mécaniques qui changent le comportement des cellules [33]. De cette manière, les propriétés mécaniques du microenvironnement participent aussi au développement tumoral et à la résistance aux thérapies [31, 34]. Cependant, les connaissances concernant l'impact des propriétés mécaniques du microenvironnement sur le développement tumoral restent limitées [35].

a) Les propriétés mécaniques du microenvironnement sont modifiées au cours de la croissance tumorale

Les tumeurs sont caractérisées par une augmentation progressive de rigidité [31]. Un tissu normal possède en général une rigidité de moins de 50kPa, un tissu fibreux possède une rigidité deux à cinq fois supérieure, mais un tissu tumoral peut présenter une rigidité jusqu'à dix fois supérieure [7, 36] (**Figure 6**). Cette augmentation de rigidité est largement exploitée pour tenter de diagnostiquer les tumeurs. Des méthodes non invasives d'échographies et de sonographies permettent de détecter des variations d'élasticité et de densité des tissus, le défi étant de différencier les tumeurs bénignes des tumeurs malignes sur ce seul paramètre [37].

Au cours du processus de transformation, il y a acquisition d'altérations génétiques par les cellules, et induction d'une prolifération incontrôlée, dans une zone d'espace restreint. Ces paramètres initiaux induisent l'apparition de forces de compressions élevées, l'augmentation de rigidité de la matrice extracellulaire, comme celle des tensions de résistance [38] (**Figure 7**).

Tout d'abord, par sa croissance même en masse compacte, la tumeur accumule un stress solide. Le groupe de R.K. Jain [39] a décrit ce stress comme étant circonférentiel et compressif au centre des tumeurs, circonférentiel et de tension en périphérie. Leur méthode d'analyse consiste à mesurer le relâchement du tissu après rupture des contraintes par excision de 80% du diamètre de la tumeur. Alors que les tissus normaux ne se déforment pas après incision, les tumeurs s'ouvrent largement en périphérie, et enflent en leur centre,

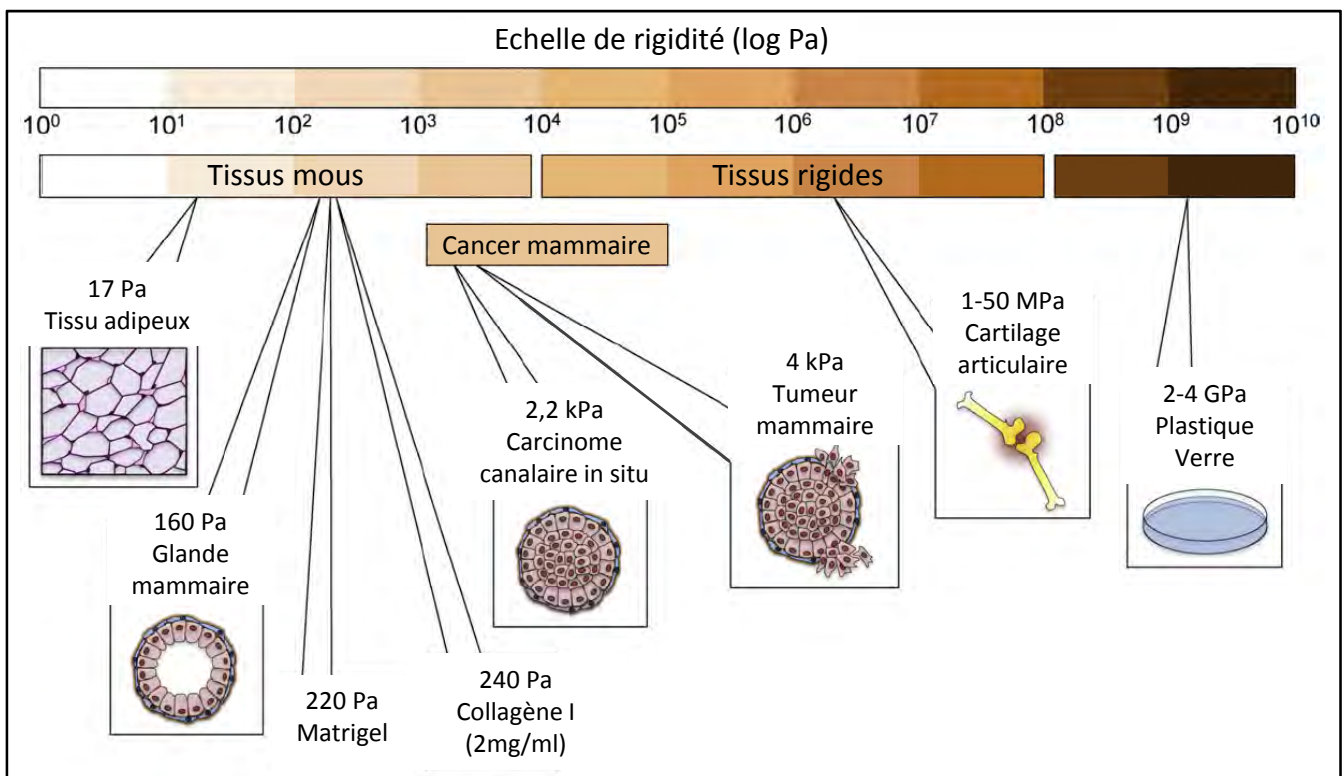


Figure 6 : Augmentation de la rigidité du tissu mammaire avec le développement tumoral

La rigidité d'un tissu est exprimé en module de Young, ou module d'élasticité, dont l'unité est le Pascal (Pa). Cette mesure correspond à la contrainte mécanique nécessaire à la déformation du tissu. Chaque tissu a une rigidité correspondante à ses fonctions, et ainsi le tissu adipeux est bien plus souple que le cartilage articulaire. La glande mammaire est normalement constituée d'une matrice souple. Au fur et à mesure du développement d'une tumeur, le tissu mammaire devient de plus en plus rigide, passant de 160 Pa à environ 4kPa. Quoiqu'il en soit, la rigidité d'un tissu tumoral n'atteint jamais la rigidité du verre ou du plastique.

Figure extraite de Correia *et al.* (2012).

reflétant l'accumulation de forces en son sein (**Figure 8**). L'augmentation de la masse tumorale provoque également l'apparition de forces de compression d'amplitude croissante exercées par les cellules tumorales sur le stroma environnant, qui peuvent se propager relativement loin de la tumeur [40].

Les modifications des relations mécaniques qui accompagnent la croissance de la tumeur provoquent une perte progressive de l'homéostasie de tension qui existait initialement au sein du tissu [32]. Les cellules tumorales présentent une mécanoréactivité altérée, c'est-à-dire qu'elles n'adaptent plus leur comportement et leur force à leur environnement [41]. Elles augmentent leur rigidité intrinsèque (liée à des anomalies de dynamique du cytosquelette), ce qui leur permet d'exercer sur le tissu environnant habituellement souple des forces anormalement élevées. Finalement, le tissu environnant qui possédait peu de forces de résistance acquiert de nouvelles propriétés mécaniques qui lui permettront de s'opposer aux forces de compression en exerçant une force de résistance sur la tumeur, de valeur proportionnelle à celle qu'il subit (**Figure 7**). Les cellules tumorales induisent elles-mêmes cette augmentation de rigidité de la matrice extracellulaire en modifiant sa composition et son organisation, la dotant de nouvelles propriétés mécaniques [42, 43].

De plus, cette augmentation de rigidité est caractéristique de la réponse desmoplasique associée au développement tumoral. La libération et l'activation de facteurs solubles ou de fragments de dégradation par les cellules tumorales induit l'activation des fibroblastes associés aux tumeurs, l'invasion de cellules immunes, une inflammation et une angiogénèse [44-46]. Les cellules du stroma vont être simulées et ainsi participer au remodelage de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes activés par les tumeurs augmentent le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire tels que le collagène [47], l'élastine ou la fibronectine, et leur assemblage est activé par l'expression élevée de protéines d'assemblage de la matrice dont les plus connues sont celles de la famille des LOX [31].

Toute cette réorganisation tissulaire autour et au sein de la tumeur participe à l'accumulation de forces, qui sont assez importantes pour entraîner la destruction des vaisseaux lymphatiques [48] et l'augmentation des forces de compression interstitielles [49].

La modification des forces et de la composition du tissu altère le comportement des cellules qui vont activer ou inhiber certaines voies de signalisation, poursuivre le remodelage du

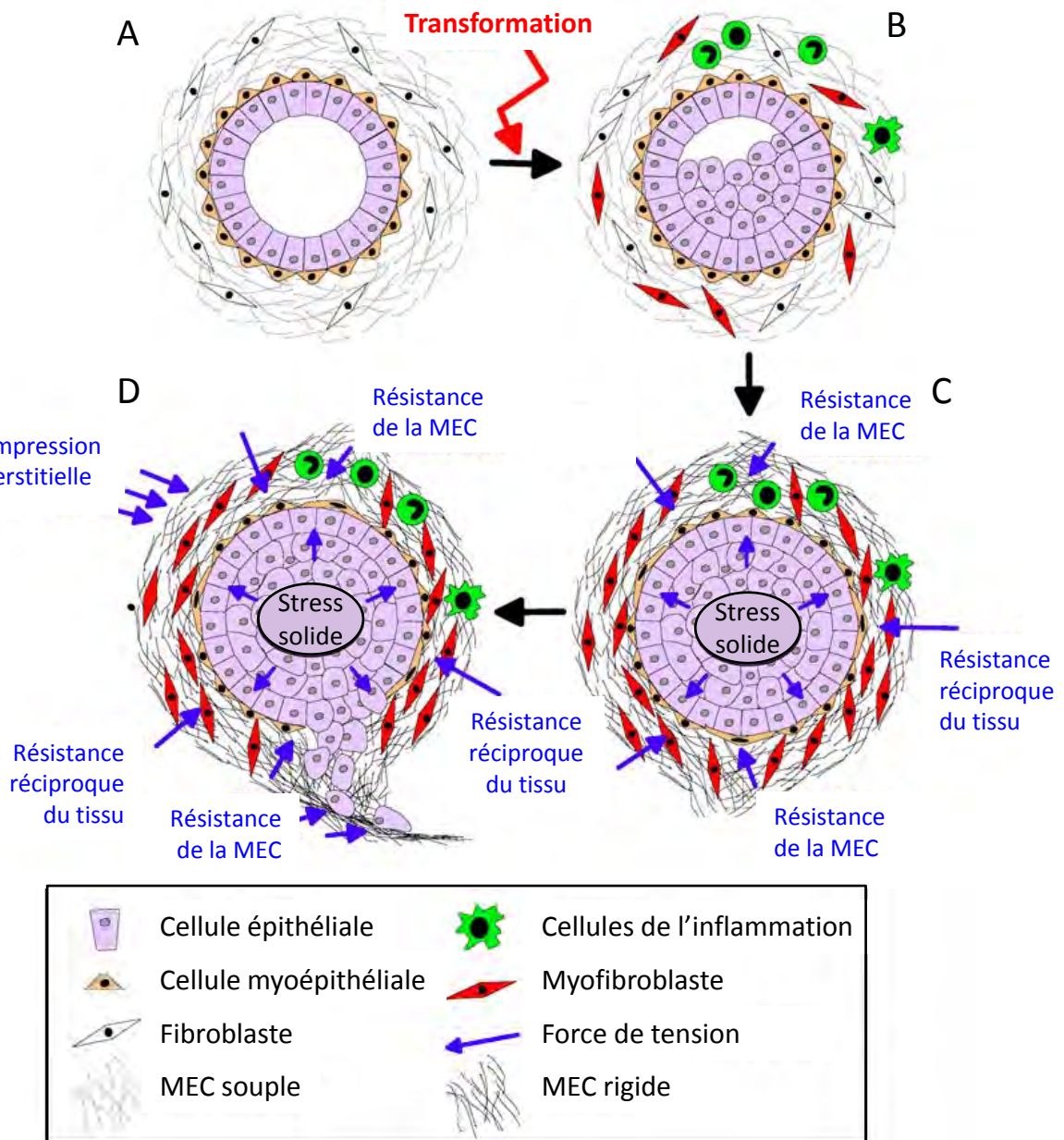


Figure 7 : Schéma représentant l'accumulation de stress au sein du tissu tumoral et la perte de mécanoréciprocité des cellules tumorales au cours du développement tumoral

(A) Le tissu mammaire normal au repos est statique et souple.

(B-D) La transformation maligne provient de l'acquisition d'altérations génétiques et de l'induction de la prolifération dans la lumière des canaux mammaires. Cette prolifération s'accompagne de l'infiltration de cellules immunes. Les cellules épithéliales transformées exercent des forces de compression d'amplitude croissante sur la membrane basale, ce qui induit l'activation de fibroblastes qui se transforment en myofibroblastes. L'apparition de ces cellules dans le stroma induit une réponse desmoplastique qui conduit à l'altération de la composition et de l'organisation de la MEC, qui voit sa rigidité augmentée. Au fur et à mesure que la tumeur croît, elle continue d'exercer des forces sur la membrane basale et sur le stroma, qui en retour exercent une force de résistance réciproque. L'accumulation de ces forces, d'altérations de la mécanoréciprocité et d'altérations génétiques induit l'invasion des cellules tumorales dans le tissu interstitiel.

MEC : matrice extracellulaire.

Figure extraite de Paszek *et al.* (2004).

microenvironnement, modifier leurs propriétés viscoélastiques pour augmenter leur tension intracellulaire et ainsi amplifier cette boucle d'accumulation de forces au sein de la tumeur en croissance [50]. Ce contrôle, par les cellules tumorales, de l'état mécanique de leur microenvironnement est essentiel au développement tumoral. En effet, l'influence de l'environnement mécanique intervient dans chacune des étapes du développement tumoral.

b) Les modifications des propriétés mécaniques du microenvironnement sont impliquées dans chacune des étapes du développement tumoral

A l'heure actuelle et bien que l'importance de l'environnement mécanique sur le destin cellulaire et tissulaire soit reconnu, nous en savons beaucoup moins sur la régulation des destins des cellules par les forces physiques que par les signaux biochimiques [51]. Les travaux réalisés à l'heure actuelle montrent essentiellement un impact de la composante mécanique du microenvironnement sur les modifications phénotypiques des cellules, sur la prolifération et la migration des cellules tumorales.

i. Transitions phénotypiques

Plusieurs études se sont d'abord attachées à montrer l'effet dominant du contexte microenvironnemental sur l'expression de phénotypes cancéreux de cellules transformées. L'injection d'un virus au potentiel oncogénique, le RSV (*Rous Sarcoma Virus*) dans des membres d'embryons de poulets n'empêche pas le déroulement correct des premières phases de développement des embryons [18]. Cependant lorsque ces membres sont soustraits à leur microenvironnement d'origine et remis en culture, ils développent un phénotype cancéreux. Ces travaux suggèrent que le contexte microenvironnemental soit dominant sur la présence de mutations oncogéniques [52]. De la même façon, Kulesa *et al.* [53] montrent que la transplantation de cellules de mélanomes dans un embryon de poule inverse le phénotype des cellules cancéreuses qui se remettent à exprimer des marqueurs de mélanocytes et neuronaux.

Il est également montré que l'environnement mécanique influence la transition épithélio-mésenchymateuse, qui est un changement de phénotype des cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux. Ce phénomène est très important dans le développement

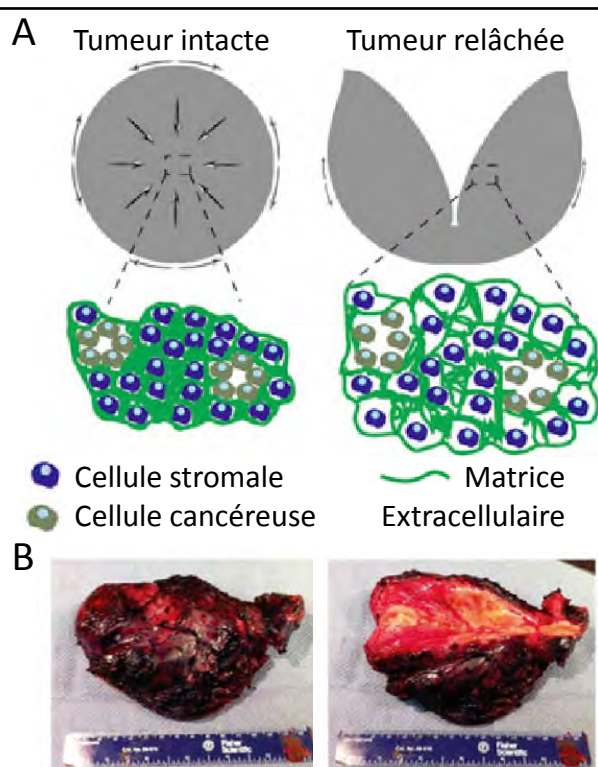


Figure 8 : Les tumeurs accumulent des forces au cours de leur croissance, qui peuvent être libérées par incision

(A) Schéma représentatif des forces accumulées dans les tumeurs sous l'effet de la croissance. Au centre, les forces compressives sont radiales et circumférentielles. Le tissu est très compact. En périphérie, les forces compressives sont radiales et les forces de tensions sont circumférentielles. L'incision de 80% du diamètre des tumeurs libère le stress et la tumeur se déforme : les bords de l'incision s'écartent et l'intérieur de la tumeur enfle. Le tissu se relâche.

(B) Photos de l'état initial d'une tumeur humaine (gauche) et de son état après incision (droite). L'écartement des bords de la tumeur est nettement visible après relâchement des tensions.

Figure extraite de Stylianopoulos *et al.* (2012)

embryonnaire, mais joue également un rôle dans le processus métastatique. Le changement de phénotype cellulaire désorganiserait le tissu et pourrait réunir les modifications tissulaires et cellulaires nécessaires à la migration et à l'invasion des cellules tumorales.

Ainsi, Brown *et al.* [54] montrent que l'augmentation de la rigidité du substrat sur lequel sont cultivées des cellules épithéliales alvéolaires induit la transition épithélio-mésenchymateuse. Cependant, cette réponse cellulaire est dépendante des protéines de la matrice extracellulaire qui recouvrent le substrat. Avec un modèle de microdispositifs adhérents qui régulent la géométrie tissulaire des cellules cultivées en monocouches, le groupe de C.M. Nelson [55] montre que l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse n'est pas homogène sur la surface multicellulaire. Seules les cellules qui sont soumises à un stress mécanique de par leur présence sur les bords du microdispositif effectuent cette transition.

L'influence de l'environnement mécanique sur le phénotype des cellules est indéniable. Cette influence pourrait participer à l'apparition de tumeurs dans des tissus dont les propriétés mécaniques ont été modifiées, par exemple suite à une modification du remodelage induit par certaines cellules qui ont été mutées, ou par une inflammation chronique [44]. Il est plus probable que la modification de l'environnement mécanique doive être associée à une mutation oncogénique pour induire la tumorigénèse, ce qui ne supprime pas l'attention particulière portée à l'environnement mécanique.

ii. Effets sur la prolifération et la survie cellulaire

De nombreuses études s'accordent à montrer que l'environnement mécanique a une influence majeure sur le contrôle de la prolifération des cellules, et par extrapolation, sur le développement tumoral.

Les groupes de R.K. Assoian et P.A. Janmey [56] démontrent le rôle prédominant de la rigidité de la matrice extracellulaire sur l'induction de la prolifération. Ils peuvent contrôler la rigidité des hydrogels sur lesquels sont cultivées les cellules en modifiant leur concentration en polyacrylamide. Cette méthode produit des hydrogels de 1,5 à 150 kPa. Les cellules cultivées sur matrice souple (<2kPa) ne prolifèrent pas, contrairement aux cellules cultivées sur matrice rigide (24kPa). La perception de la matrice rigide par les cellules

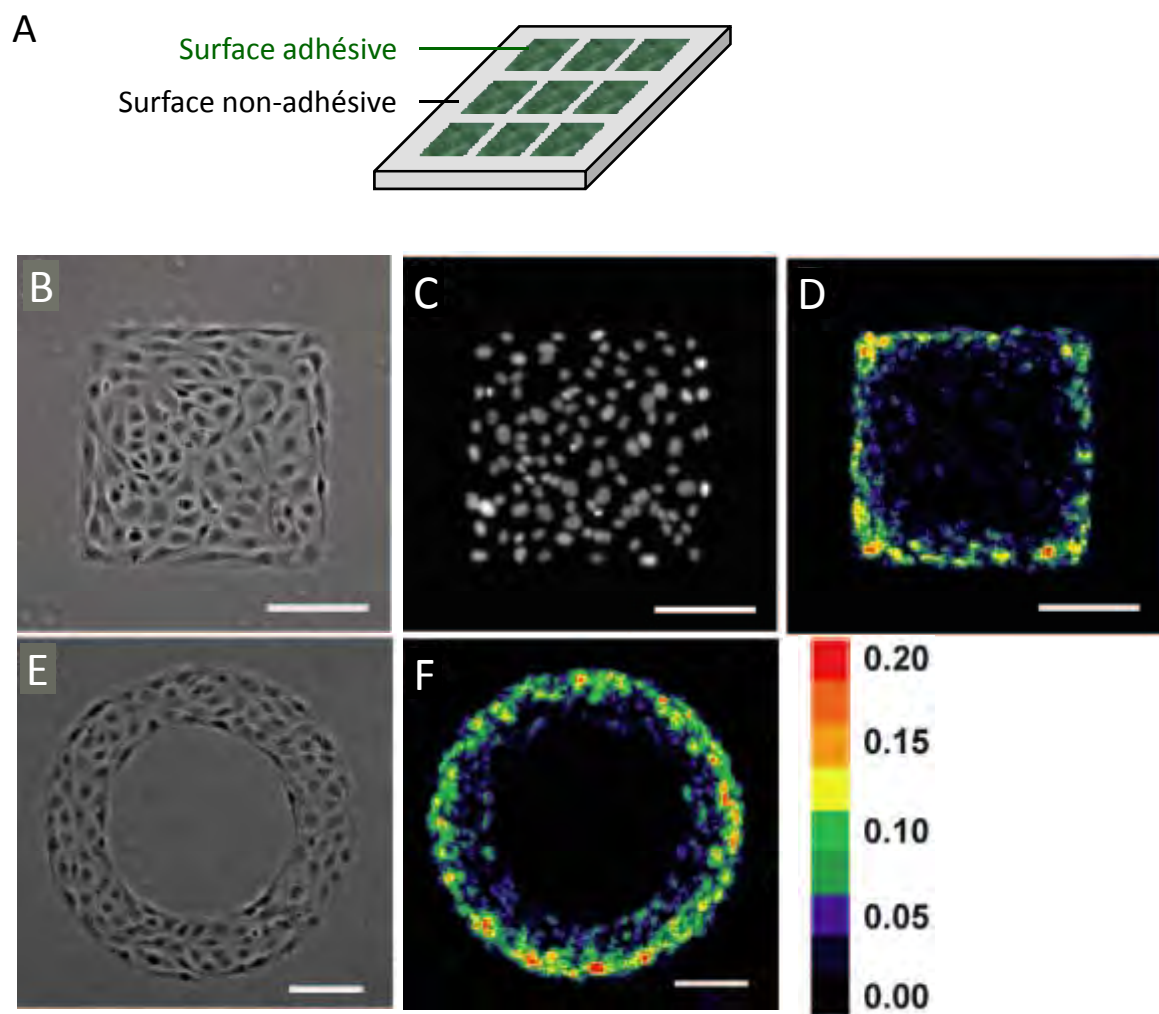


Figure 9 : Description des microdispositifs adhésifs pour la culture de cellules en monocouche

(A) Schéma représentatif de microdispositifs adhésifs. Les cellules se concentrent uniquement sur les surfaces adhésives, ce qui permet de contrôler la forme des motifs multicellulaires.

(B) Image en contraste de phase de cellules sur un îlot adhésif carré de 250µm de côté.

(C) Image en fluorescence des noyaux (DAPI). Les cellules se distribuent uniformément sur le dispositif adhésif et forme une monocouche.

(D) Moyenne d'intensité de fluorescence d'un stack d'image en fluorescence des cellules prolifératives (incorporation de BrdU) sur un îlot adhésif carré de 250µm de côté.

(E) Image en contraste de phase de cellules sur un îlot adhésif en anneau.

(F) Moyenne d'intensité de fluorescence d'un stack d'image en fluorescence des cellules prolifératives (incorporation de BrdU) sur un îlot adhésif en anneau.

La barre d'échelle colorimétrique indique le pourcentage de cellules en prolifération à la localisation indiquée. Un indice de 0.20 sur un pixel donné indique 20% de cellules prolifératives en cet endroit.

Figure extraite de Nelson *et al.* (2005).

induit l'expression de la Cycline D1 et l'entrée en phase S. Sa surexpression ne suffit pas à faire entrer les cellules cultivées sur matrice souple en phase S, or, elle est souvent surexprimée dans les cancers mammaires. Ces résultats suggèrent que la rigidité du microenvironnement tumoral participe à la pleine activation des Cyclines D1 surexprimées pour augmenter la prolifération tumorale. Schrader *et al.* [34] ont reproduit l'induction de la prolifération de cellules cancéreuses par un substrat rigide, et montrent également que la culture de ces même cellules sur un substrat souple réduit la prolifération et augmente le taux de cellules en quiescence. Ces dernières sont plus sensibles aux traitements que les cellules cultivées sur matrice rigide, mais celles qui survivent ont de meilleures capacités clonogéniques. Ils soulignent donc l'hypothèse qu'un environnement souple, tel qu'il peut exister dans la moelle osseuse par exemple, permet d'induire, chez les cellules cancéreuses, un phénotype proche de celui des cellules souches. Elles participeront alors à la récurrence du cancer après traitement.

A nouveau, avec les microdispositifs adhésifs, le groupe de C.M. Nelson [57] démontre que la prolifération se concentre dans les zones où les cellules exercent davantage de forces de traction sur le substrat (**Figure 9**). Par des méthodes de microfluidique, ils sont parvenus à reproduire l'environnement des canaux mammaires et ils observent que l'activation de la prolifération de cellules tumorales non invasives entourées de cellules normales n'est effective que dans des régions de haut stress mécaniques, c'est-à-dire au niveau des extrémités des canaux [58]. En analysant la localisation des tumeurs développées le long des canaux mammaires chez la souris, ils montrent également que ces régions sous stress mécanique important sont les régions de développement préférentiel des tumeurs. Ces résultats suggèrent que les régions de moindre stress mécanique empêchent la formation des tumeurs.

Wang *et al.* [41] montrent quant à eux que la régulation de la prolifération par la rigidité du substrat peut être altérée dans les cellules transformées, ce qui conduit à un échappement des cellules vis-à-vis du contrôle de la prolifération par leur microenvironnement.

Des études portant sur l'impact de la contrainte mécanique sur la croissance de sphéroïdes ajoutent une dimension multicellulaire à la réponse aux contraintes. L'équipe de R.K. Jain

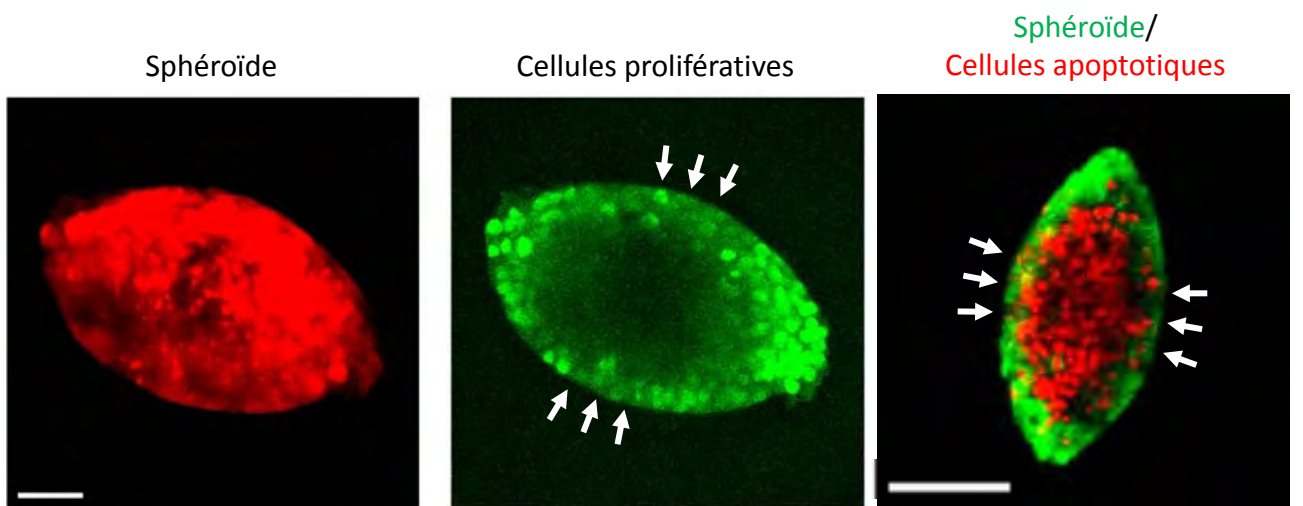


Figure 10 : Les contraintes mécanique impactent la prolifération et l'apoptose au sein des sphéroïdes

Images en fluorescence de sphéroïdes cultivés enrobés dans de l'agarose 0,5%. Sous l'effet des contraintes, les sphéroïdes ont rompu le gel et ont pris une forme ovale. A gauche : image en fluorescence d'un sphéroïde. Barre d'échelle : 50µm. Milieu : Image en fluorescence des cellules prolifératives. Elles se concentrent dans les zones de moindre compression. A droite : Image en fluorescence d'un sphéroïde (vert) et des cellules apoptotiques (rouges). Elles se concentrent dans les zones de forte compression. Barre d'échelle : 100µm. Les flèches représentent les zones de fortes tensions.

Figure extraite de Cheng *et al.* (2009).

[59] montre que la contrainte mécanique induite par la croissance de sphéroïdes dans des gels d'agarose induit une diminution de la croissance qui s'accompagne d'une réduction de la prolifération et de l'apoptose. Vingt années plus tard, il montre qu'au sein des sphéroïdes comprimés par leur croissance dans un gel, la prolifération se concentre dans les zones de moindre compression, alors que l'apoptose se concentre dans les zones de forte compression [60] (**Figure 10**). Les différences des effets observés sont peut-être dépendantes de la lignée cellulaire ou de la cinétique de croissance dans les gels d'agarose, mais les deux études soulignent l'impact de la contrainte mécanique sur le contrôle de la prolifération et de l'apoptose.

Toutefois, la preuve la plus remarquable du rôle de l'augmentation de la rigidité du microenvironnement et des forces associées dans le développement tumoral provient des travaux du groupe de V.M. Weaver [31]. Ils montrent, d'une part, que la réduction de l'assemblage des fibres de collagène par l'inhibition de la protéine LOX (*Lysyl Oxydase*) diminue la rigidité des tumeurs développées dans les glandes mammaires de souris. D'autre part, que cette diminution de rigidité réduit les capacités de développement tumoral de cellules épithéliales mammaires transformées. Les tumeurs développées chez les souris dont le microenvironnement est rendu plus souple sont plus petites et de grade moins élevé que celles développées chez les souris contrôles. L'assouplissement de la matrice extracellulaire réduit l'incidence des tumeurs et retarde leur apparition. Ces travaux donnent ainsi la preuve directe que la rigidité et l'assemblage de la matrice extracellulaire participe au développement tumoral.

iii. Effets sur la structure et la mobilité des cellules

Les démonstrations directes de l'impact de la rigidité de la matrice extracellulaire sur la structure et la mobilité cellulaire se multiplient. Chaque modèle a ses avantages et ses inconvénients, mais également sa relevance biologique.

Pelham *et al.* [61] ont développé de fines couches de gels de polyacrylamide recouverts de collagène pour étudier l'adhésion et la mobilité des cellules selon la flexibilité des gels. Ils démontrent une diminution de l'étalement cellulaire et une augmentation de la mobilité des cellules avec l'augmentation de la flexibilité du gel. Cette technique a été perfectionnée par Lo *et al.* [62] qui ont alterné des zones de plus ou moins grande rigidité dans leurs gels de

polyacrylamide. Ils observent que les cellules migrent constamment vers les zones de plus grande rigidité.

Des comportements similaires ont été observés par Hidjipanayi *et al.* [63] dans une matrice de collagène en 3 dimensions. Ces travaux sont basés sur l'utilisation d'une matrice composée de feuilles de collagènes superposées et ayant une densité en collagène croissante afin de créer un gradient de rigidité variant de 1000 à 2300 kPa. Après 6 jours de culture, les fibroblastes s'accumulent effectivement dans la partie la plus rigide de la matrice.

Les capacités d'invasion des cellules tumorales cultivées dans les canaux mammaires dépendent également de la localisation des cellules tumorales dans le microdispositif [58]. A nouveau, les régions de fort stress mécanique induisent davantage l'invasion des cellules tumorales, bien qu'il semble que le seuil d'induction soit relativement faible.

Pathak *et al.* [64] démontrent également, en mesurant la vitesse de migration de cellules à travers des canaux de diamètre et de rigidité contrôlés, l'importance du confinement sur la rigidité de la matrice extracellulaire dans le contrôle de la migration cellulaire. Le confinement induit l'alignement et la polarisation des forces dans une direction, accélérant ainsi la vitesse de migration. Dans une autre publication [65], ils montrent que l'activation d'oncogènes modifie le contrôle de la migration des cellules par la rigidité et le confinement et que ce phénomène peut s'expliquer par des modifications dans la structure et la forme des cellules.

Le groupe de V.M. Weaver [31] apporte également des preuves que la rigidité de la matrice extracellulaire et l'assemblage des fibres de collagène coopèrent pour promouvoir l'invasion des cellules tumorales. Seule l'augmentation conjointe de l'assemblage des fibres de collagène et de la rigidité induit la désorganisation des cellules épithéliales cultivées dans du gel contenant du collagène, mais n'induit pas l'invasion des cellules. Ils montrent également que la perception de ces modifications de la matrice extracellulaire est transmise via les jonctions cellules-matrices constituées d'intégrines. L'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation induite par l'activation des intégrines permet de restaurer l'organisation des cellules tumorales et d'annuler le phénotype invasif induit par le microenvironnement. Ces travaux soulignent donc l'importance de l'identification des voies de la mécanotransduction activées dans les tumeurs pour trouver de nouvelles cibles d'agents anticancéreux.

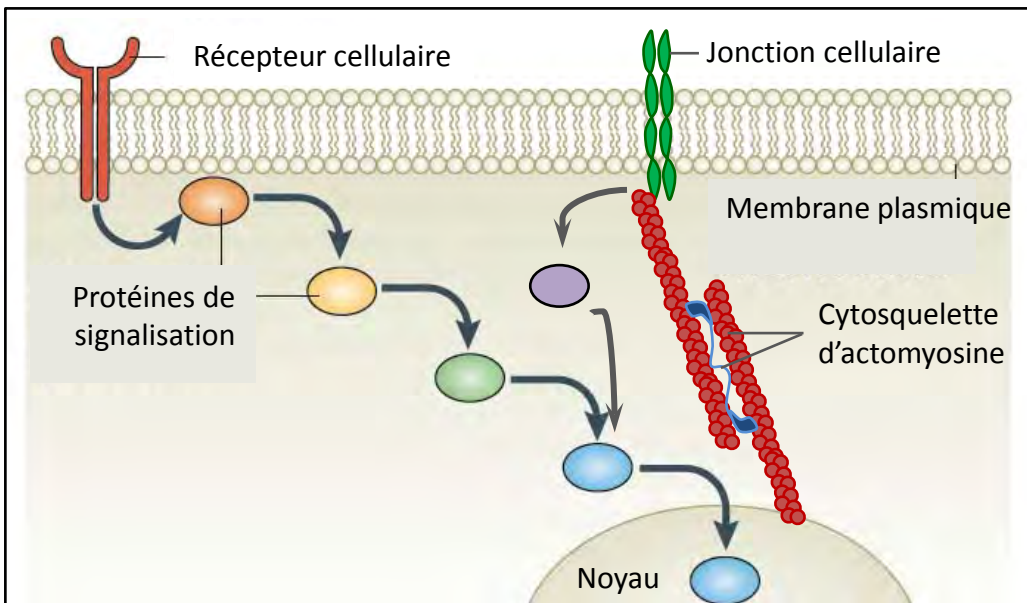


Figure 11 : Les différents mécanismes de la mécanotransduction

La mécanotransduction est la transmission d'un signal mécanique en signal intracellulaire qui induira une modification du comportement cellulaire en conséquence. La mécanotransduction se fait par exemple par le changement de conformation ou de configuration de protéines à la surface de la cellule, telles que les récepteurs membranaires, ou les protéines des jonctions cellules-cellules et cellules-matrices. Le signal peut être transduit jusqu'au noyau par une voie de signalisation biochimique, par une continuité physique entre la membrane et le noyaux via le cytosquelette d'actomyosine, ou par une association des deux phénomènes.

Figure inspirée de Dufort *et al.* (2011).

3) Les acteurs moléculaires de la réponse mécanique

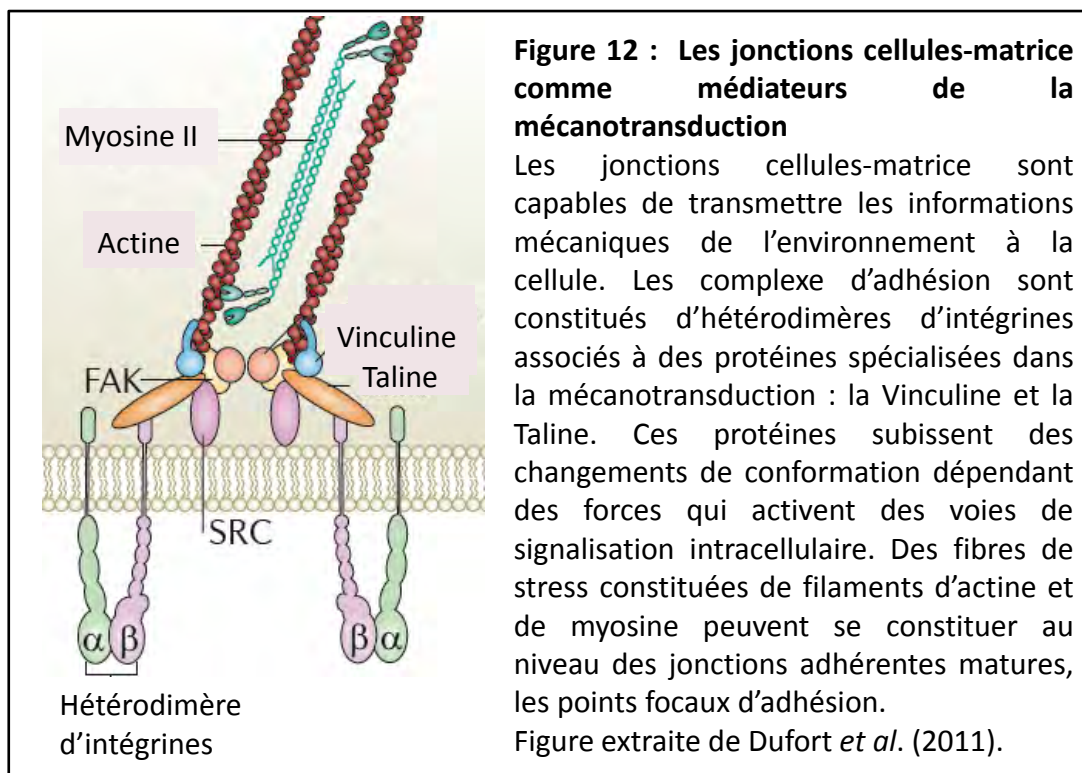
Des variations de forces aussi importantes et impliquées dans des réponses cellulaires aussi diverses nécessitent que les cellules possèdent des éléments de perception de leur environnement qui transmettent le signal au niveau intracellulaire pour induire une réponse adaptée. Les acteurs moléculaires de cette mécanotransduction, c'est-à-dire de la conversion d'un signal mécanique en un signal biochimique induisant une réponse spécifique des cellules à leur environnement mécanique [66], incluent des mécanorécepteurs localisés à la membrane plasmique, capables de détecter des forces et des rigidités variables, qui vont activer des voies de signalisation biochimique comportant des mécano-effecteurs intracellulaires. Ces voies vont spécifiquement modifier l'expression des gènes, ou permettre à la cellule d'exercer des forces réciproques sur le microenvironnement grâce à son cytosquelette (**Figure 11**). Les réponses induites sont les préludes du changement du comportement cellulaire vers une augmentation de la prolifération, vers un début de migration ou vers une différenciation [38, 67].

Les voies et les éléments de mécanotransduction décrits ci-dessous ne sont pas exclusifs, et sont ceux dont les caractéristiques sont les mieux décrites.

a) Les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire dépendent de sa composition moléculaire.

Les tissus sont composés de cellules et d'un support protéique appelé matrice extracellulaire [68]. Cette matrice extracellulaire est composée de protéines matricielles et de protéines non matricielles telles que des facteurs solubles libérés par les cellules incluant des cytokines par exemple. La matrice extracellulaire est majoritairement composée de quatre grandes familles de macromolécules : les collagènes, des glycoprotéines de structure, des protéoglycanes et les élastines. Leurs proportions et leurs mode d'organisation donnent naissance à une surprenante diversité de structures aux propriétés mécaniques variées. Parmi ces macromolécules, le collagène et l'élastine participent aux propriétés visco-élastiques de la matrice extracellulaire.

Le collagène est une molécule longue et rigide, conférant une résistance mécanique aux tissus. Les collagènes fibrillaires s'assemblent en fibrilles, qui peuvent elles-mêmes s'associer



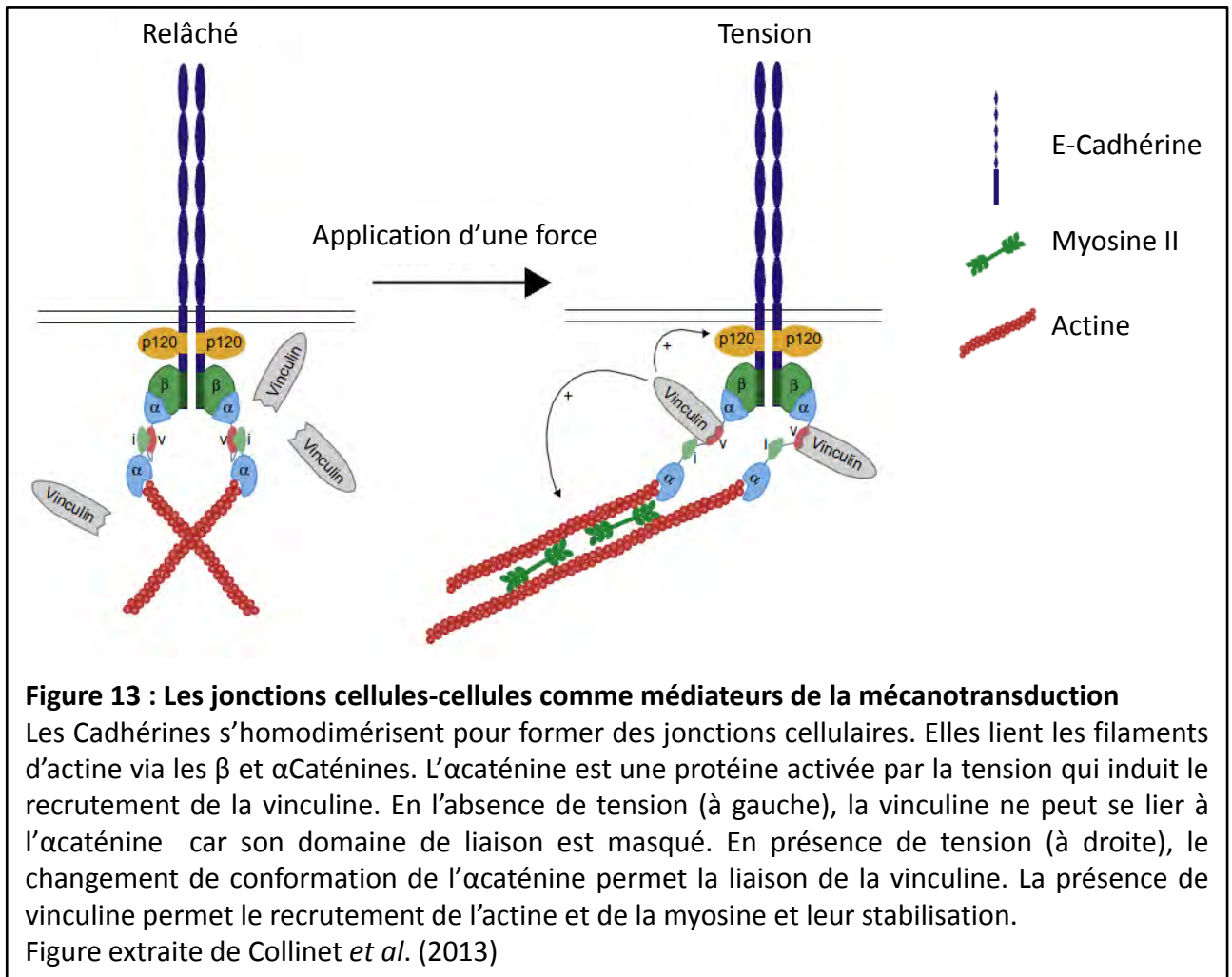
en faisceaux plus larges, ou fibres [69, 70]. Cette organisation est guidée par la cellule sécrétrice elle-même. L'élastine est le composant majeur des fibres élastiques, qui forment un réseau plus ou moins dense selon les tissus. Bien qu'elles appartiennent à des familles différentes, les nombreuses interactions qui existent entre les macromolécules de la matrice extracellulaire participent à la mise en place et au maintien de la cohésion tissulaire, sous le contrôle des cellules du tissu.

La densité, la composition et le degré de polymérisation des protéines matricielles de la matrice extracellulaire influencent notablement la rigidité du tissu. Parmi les paramètres mécaniques caractérisant la rigidité de la matrice extracellulaire, les plus utilisés sont l'élasticité, ou la compliance. Elle est mesurée par la pression nécessaire à la déformation du milieu. Les cellules établissent des contacts étroits avec la matrice extracellulaire, qui vont lui permettre de percevoir sa composition et ses propriétés mécaniques, et de s'y adapter.

b) Implication des jonctions cellules-matrice et cellules-cellules dans la mécanotransduction.

Les forces existantes au sein d'un tissu sont transmises de cellule à cellule sur de longues distances [71] par la cohésion tissulaire, et donc par les jonctions cellules-matrice et cellules-cellules [72].

L'adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire est permise par les intégrines qui peuvent lier spécifiquement une multitude de ligands. Ce sont des hétérodimères de deux chaînes polypeptidiques transmembranaires α et β , dont la diversité contribue à des spécificités de liaisons variées (**Figure 12**). L'interaction des domaines cytoplasmiques des intégrines permet leur regroupement au niveau de points focaux d'adhésion. La maturation de ces complexes nécessite l'application d'un stress mécanique [73] ou une rigidité de la matrice extracellulaire importante [74], et entraîne le recrutement et l'activation de protéines de structure et de signalisation telles que la taline, la vinculine ou l' α -actinine. Ces protéines se lient à la région cytoplasmique des intégrines et fixent également les filaments d'actine. Cependant, les jonctions cellules-matrice s'organisent différemment *in vivo*, et cette organisation peut être reproduite lorsque les cellules sont cultivées en 3D [75]. La colocalisation des protéines des jonctions cellules-matrice est plus importante et induit un attachement plus fort et une adaptation de la morphologie cellulaire à l'environnement plus



rapide. La perception de l'environnement mécanique par les intégrines est transmise au niveau des jonctions cellules-matrice via l'activation de voies de signalisation impliquant différentes protéines telles que les kinases FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et Src (*Sarc*). La phosphorylation de ces protéines, induit l'activation en cascade de voies de transduction régulant de nombreux processus cellulaires, dont la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la motilité [76]. FAK semble être la première protéine de la voie de signalisation induite par une perception de tension. Sa phosphorylation est par exemple nécessaire à la progression en G1 [77], mais les groupes de P.A. Janmey et R.K. Assoian [56] montrent que cette phosphorylation seule n'est pas suffisante à induire l'entrée de cellules en phase S et que la formation d'un complexe entre FAK et les intégrines est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation sous jacente. Ces travaux soulignent la précision de la perception de l'environnement mécanique, et la complexité du contrôle de l'activation des voies de signalisation qui en résultent.

Les voies de signalisation citées ci-dessus régulent également la contractilité du cytosquelette d'actomyosine au niveau des points focaux d'adhésion.

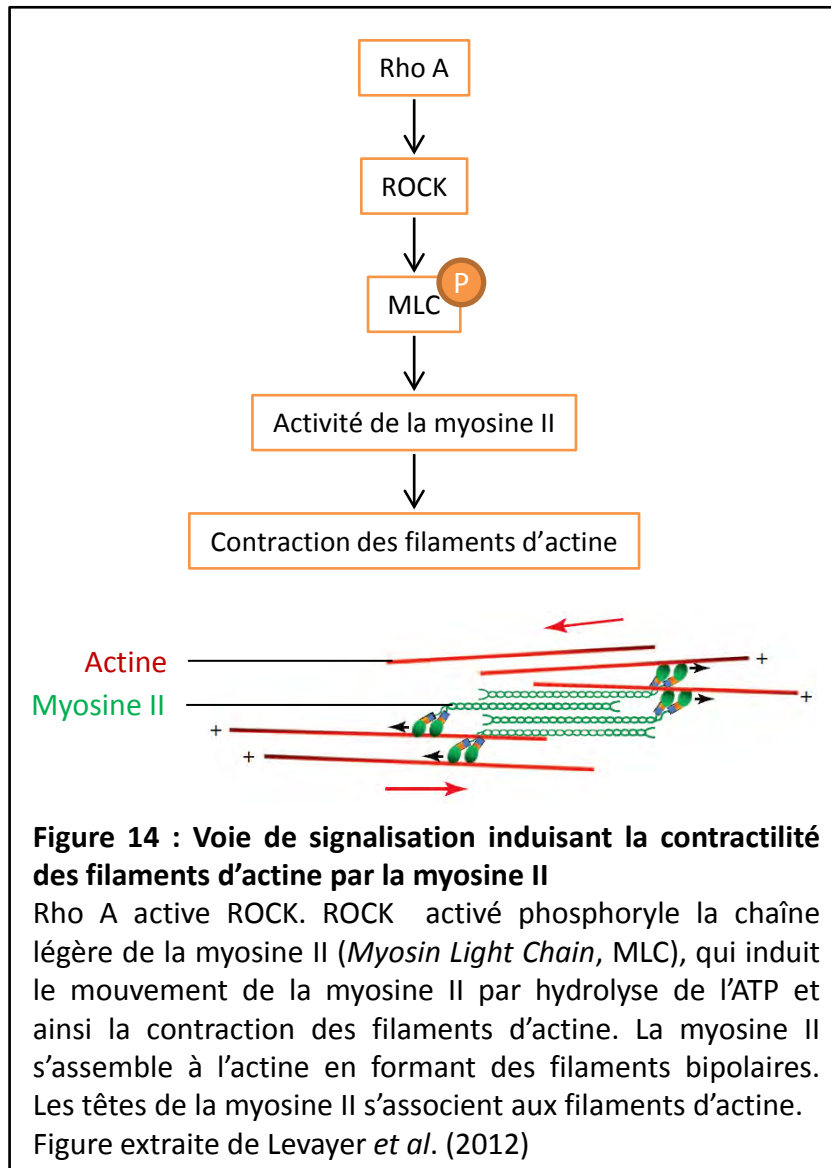
La transmission des forces passe également par les jonctions cellules-cellules [72, 78]. Parmi les différents types de jonctions existants, les jonctions adhérentes impliquant les protéines d'adhésion appartenant au groupe des cadhérines « classiques » ont récemment été impliquées dans les processus de mécanotransduction [79]. La E-Cadhérine, principalement exprimée dans les tissus épithéliaux, est probablement la mieux décrite. L'adhésion cellule-cellule est permise par l'organisation des Cadhérines en tandem via des interactions homophiliques dépendantes du Ca^{2+} . Sous cette forme, les Cadhérines sont capables de former un dimère avec des Cadhérines d'une cellule voisine, ce qui permet l'adhésion cellulaire (**Figure 13**). Des jonctions adhérentes spécialisées existent également dans certains tissus. L'engagement des domaines extracellulaires des E-Cadhérines entraîne le recrutement de protéines structurales et de signalisation au niveau de leur domaine cytoplasmique. La β -caténine se lie à la queue cytoplasmique des E-Cadhérines, et s'attache en retour l' α -caténine. Cette dernière fixe l'actine. La connexion des Cadhérines à l'actine peut être renforcée par d'autres protéines. Cette disposition des éléments permet une continuité physique entre les cytosquelettes des cellules adjacentes [80]. Le regroupement de nombreuses Cadhérines et leur ancrage au cytosquelette d'actine est nécessaire à la

maturation des adhésions en jonction rigides et résistantes (**Figure 13**). La régulation de l'adhésion est permise par un remodelage constant des couples Cadhérines-caténine [81], ce qui permet une liberté de mouvements et de déformations cellulaires importante. Ce remodelage est permis par un contrôle réciproque entre les E-Cadhérines et l'actine. D'une part, le regroupement des molécules d'E-Cadhérine induit l'activation de voies de signalisation dépendantes de Rho et Rac, entraînant le recrutement et l'activation de protéines telle ARP2/3 [82] et les formines [83], qui participent à la réorganisation de l'actine dans la cellule. D'autre part, l'assemblage de l'actine régule le renouvellement des E-Cadhérines en contrôlant leur endocytose. La myosine II intervient également dans le contrôle de la distribution des E-Cadhérines à la surface des cellules [84]. Les Cadhérines participent à la mécanotransduction par le recrutement de l' α -caténine et de la vinculine lors de la perception de tensions au niveau des jonctions intercellulaires [85]. Ce recrutement permet celui de la myosine II, qui participe à la réorganisation des filaments d'actine (**Figure 13**).

c) Le cytosquelette d'actomyosine est un acteur structurel de la mécanotransduction

Le cytosquelette des cellules est un réseau dense qui structure une cellule eucaryote tout en lui donnant sa forme et sa rigidité mécanique. L'ensemble des constituants du cytosquelette et des protéines associées participent à la mobilité cellulaire, au transport de vésicules et de ribosomes, à la mitose, et à la mécanotransduction. Chacune des fonctions du cytosquelette est finement régulée et synchronisée avec le reste des fonctions de la cellule. Il existe trois types distincts de molécules servant d'éléments structuraux du cytosquelette : les filaments d'actine, les microtubules, et les filaments intermédiaires [86] dont les propriétés visco-élastiques et les fonctions varient [87].

Le cytosquelette d'actomyosine est l'acteur majeur de la mécanotransduction. Il transmet les tensions perçues, de la membrane à l'ensemble de la cellule, et permet aux cellules d'exercer une tension réciproque sur l'environnement. Les filaments d'actine sont moins rigides que les microtubules, mais la forte concentration de protéines de liaison qui régulent l'organisation de l'actine en fait une structure très rigide. La F-actine possède la plus grande résistance à la déformation, ce qui justifie la présence d'un réseau d'actine cortical, localisé



juste sous la membrane plasmique, pour faciliter les déformations subies par les cellules mobiles par exemple. Le cortex d'actine est composé de filaments d'actine orientés de façon oblique, formant un réseau dense et dynamique. Une taille réduite des filaments d'actine et leur fort assemblage participent à l'arrondissement des cellules [88]. Des mesures de la pression d'arrondissement des cellules mitotiques par la microscopie à force atomique précisent que l'arrondissement dépendant du cytosquelette d'actomyosine induit une augmentation de pression intracellulaire qui permet aux cellules d'exercer des forces importantes sur leur environnement [89]. Ainsi, de part ses propriétés mécaniques et son organisation, les filaments d'actine participent à la forme et aux propriétés mécaniques des cellules.

La régulation de leur organisation et l'induction de tension à l'intérieur de la cellule est permise par la dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine, ainsi que par la contractilité de ces filaments, c'est-à-dire les mouvements des filaments les uns par rapport aux autres. L'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine se fait par adjonction et disjonction de sous-unités aux extrémités des filaments. La dynamique des filaments d'actine est régulée par des protéines de liaison à l'actine, comme les complexes Arp2/3 responsables de la nucléation de nouveaux filaments d'actine ou les protéines de coiffe responsable de l'arrêt de l'assemblage et/ou de la rupture des filaments d'actine. L'assemblage et le désassemblage des filaments peuvent être très dynamiques et permanents. La contractilité des filaments d'actine est permise par une catégorie de protéines motrices déjà décrite précédemment : la myosine. L'activation de la myosine II est dépendante de la voie de signalisation des Rho. Rho A active ROCK (*Rho-associated protein kinase*), qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine II non musculaire induisant ainsi l'activité contractile de la myosine II [90, 91] (**Figure 14**). La myosine s'assemble alors en filaments bipolaires dont les domaines moteurs, présents à chaque extrémité, peuvent interagir avec deux filaments d'actine. Sa fonction ATPase permet la capture et l'hydrolyse de l'ATP (Adenosine-5'-triphosphate) pour produire l'énergie nécessaire à son changement de conformation. Ceci résulte en un glissement des deux filaments d'actine l'un vers l'autre, ce qui provoque la contraction. L'activité de la myosine est dépendante de son attachement à l'actine, et est régulé par sa phosphorylation. De plus, la myosine peut être considérée

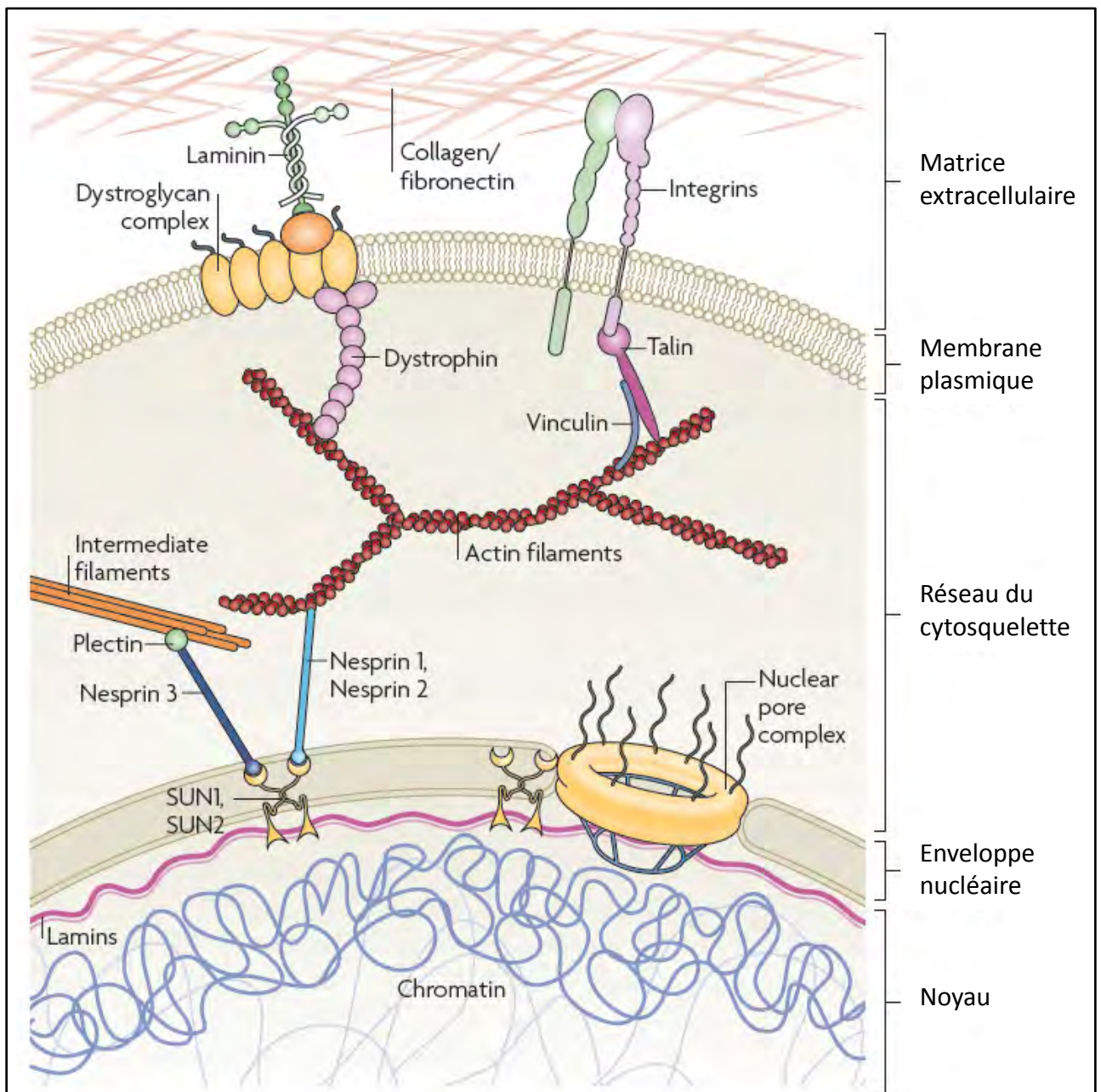


Figure 15 : La mécanotransduction par un lien physique de la membrane plasmique au noyau

Les forces extracellulaires sont transmises de la matrice extracellulaire aux jonction cellulaire. Ces jonctions sont connectées au cytosquelette, en particulier aux filaments d'actine. L'affinité de liaison entre ces éléments est régulées par les signaux intra et extracellulaires. La force intracellulaire est transmise par les filaments d'actine, qui sont eux-mêmes connectés au noyau par des protéines telles que les Nesprines. Les nesprines interagissent avec le membrane nucléaire interne et ses protéines SUN1/2. SUN1/2 sont maintenus à la membrane interne par la lamine, constituée de filaments intermédiaires organisés de façon stable et qui peut interagir avec la chromatine. Ainsi, les forces sont transmises par un lien physique continu de la matrice extracellulaire jusqu'à l'ADN.

Figure extraite de Jaalouk *et al.* (2009).

comme une protéine d'assemblage des filaments d'actine car elle possède de multiples sites de liaisons à l'actine.

La modification de l'organisation intracellulaire entre les composants du cytosquelette, les protéines d'assemblage et les protéines motrices régule la tension intracellulaire. Ceci peut avoir un impact direct sur le recrutement ou l'activité des protéines des voies de signalisation intracellulaires. La tension intracellulaire peut également affecter la conformation de la chromatine, modulant ainsi l'accès des facteurs ou de la machine de transcription [92].

d) La mécanotransduction jusqu'au noyau

Les processus de mécanotransduction régulent fonctionnellement la chromatine selon essentiellement deux processus. L'un est la connexion directe physique entre les filaments d'actine et la chromatine, et l'autre se fait par le biais de facteurs nucléaires ou de transcription.

i. Par une connexion physique de l'actine à la chromatine

La membrane interne de l'enveloppe nucléaire est couplée à un réseau de filaments intermédiaires de lamines, appelé lamina nucléaire. Les pores nucléaires et des protéines de liaison de la lamina nucléaire à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire créent des sites d'attachement de la chromatine (**Figure 15**).

Côté cytoplasmique, des composants de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, dont les nesprines, lient les filaments d'actine ou les filaments intermédiaires au noyau [93]. Les nesprines interagissent avec des protéines de la membrane nucléaire, tels SUN1 ou SUN2, qui interagissent elles-mêmes avec les protéines de l'enveloppe nucléaire, dont les lamines [94]. Les lamines et les protéines SUN sont liées aux pores nucléaires, participant à l'interaction avec le cytosquelette intranucléaire. Finalement, les lamines établissent aussi des liaisons avec la chromatine [95] et participent à son organisation et à sa régulation [96]. Bien qu'elle demeure encore peu connue, l'actine nucléaire participerait à la mécanotransduction à l'intérieur du noyau [97, 98]. L'ensemble de ces connexions directes, augmentées par l'activation des voies effectrices biochimiques, aboutit à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse de nombreuses protéines. Des

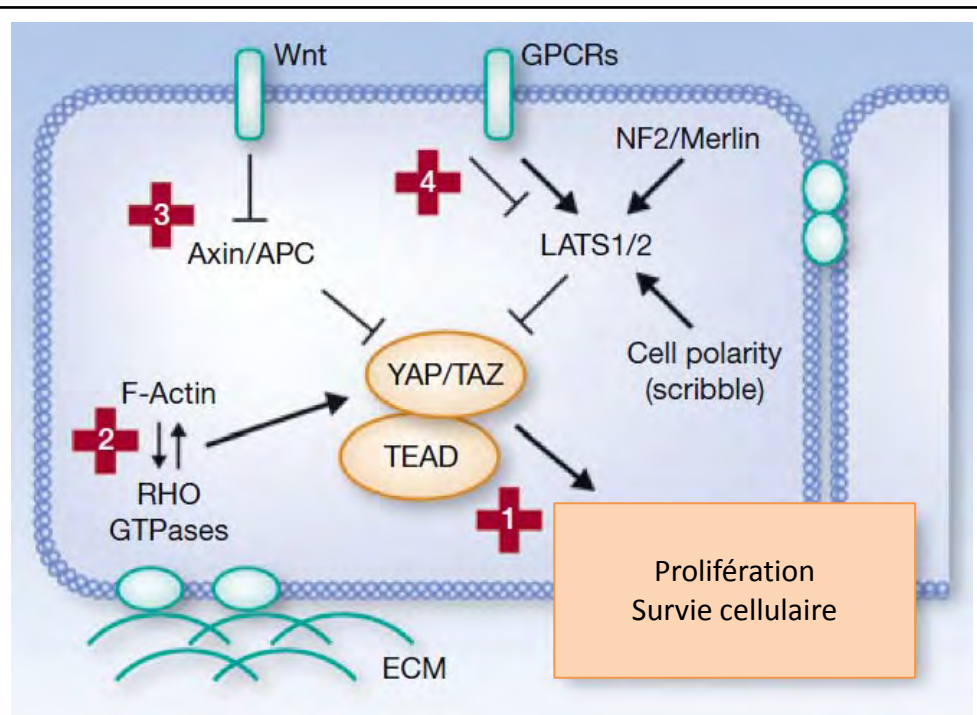


Figure 16 : La mécanotransduction par les facteurs nucléaire YAP/TAZ

YAP/TAZ sont des coactivateurs transcriptionnels qui ont un rôle central dans la transmission des signaux extracellulaires. YAP/TAZ se lie dans le noyau au facteur de transcription TEAD pour réguler la transcription des gènes et ainsi la prolifération et la survie (1). YAP/TAZ sont régulés par l'adhésion cellulaire et les propriétés mécaniques de l'environnement qui sont transmis à la cellule par les filaments d'actine et la voie de signalisation dépendante des Rho GTPases (2). Ils sont également régulés par d'autres voies de signalisation telles que celle de Wnt (3) et des GPCRs (4).

Figure extraite de Piccolo *et al.* (2013).

mutations dans chacun de ces composants cellulaires perturbent la mécanotransduction et altèrent la réponse cellulaire. Inversement, un environnement mécanique modifié entraîne des distorsions nucléaires ou des altérations de l'expression génique, et induit des comportements cellulaires différents et dérégulés [99]. De las Heras *et al.* [100] passent en revue les altérations de l'enveloppe nucléaire impliquées dans les cancers. Par exemple, certaines protéines de l'enveloppe nucléaire lient des régulateurs du cycle cellulaire, ce qui induit une dérégulation de la prolifération.

ii. Par des facteurs nucléaires ou de transcription

Plusieurs facteurs ont été décrits pour transmettre les signaux mécaniques jusqu'au noyau pour adapter la réponse cellulaire [101]. Parmi eux, les plus connus sont YAP (*Yes-associated protein*) et son cofacteur TAZ. YAP et TAZ sont des facteurs nucléaires qui transmettent la perception d'un stimulus mécanique jusqu'au noyau [102] (**Figure 16**). YAP/TAZ est activé à l'état déphosphorylé et se localise alors dans le noyau, où il agit comme coactivateur de facteurs de transcription tels que TEAD. Il est inactivé lorsqu'il est phosphorylé par LATS1/2 (Large Tumor Suppressor). Son inactivation conduit à sa séquestration dans le cytoplasme ou à sa dégradation. YAP/TAZ est un fort régulateur de la prolifération [103, 104] et de la différenciation des cellules [105, 106] et participe ainsi au contrôle de la croissance des organes. Sa régulation s'opère conjointement par la voie de signalisation Hippo [107], et par la tension du cytosquelette d'actine. Elle semble d'ailleurs dominée par cette dernière [105]. En effet, YAP/TAZ est activé par une matrice extracellulaire rigide, par l'étalement et par l'étirement [103]. Il est un médiateur clé de la réponse biologique aux propriétés mécaniques du microenvironnement. L'inhibition de YAP/TAZ dans des cellules mésenchymateuses cultivées sur matrice rigide suffit à elle seule à induire la différenciation en adipocytes, obtenue normalement sur matrice souple, plutôt qu'en ostéoblastes, normalement observée dans ces conditions [105]. Les tumeurs sont capables de détourner les propriétés de YAP/TAZ pour promouvoir leur croissance. Ainsi, la surexpression de TAZ dans des mammosphères de cellules tumorales induit une chimiorésistance et la dédifférenciation des cellules [108]. L'expression de TAZ dans les tumeurs est associée à une survie faible et à des stades métastatiques. YAP est également activé dans certains cancers [109]. L'inhibition des effets de YAP/TAZ représenterait une voie de thérapeutique

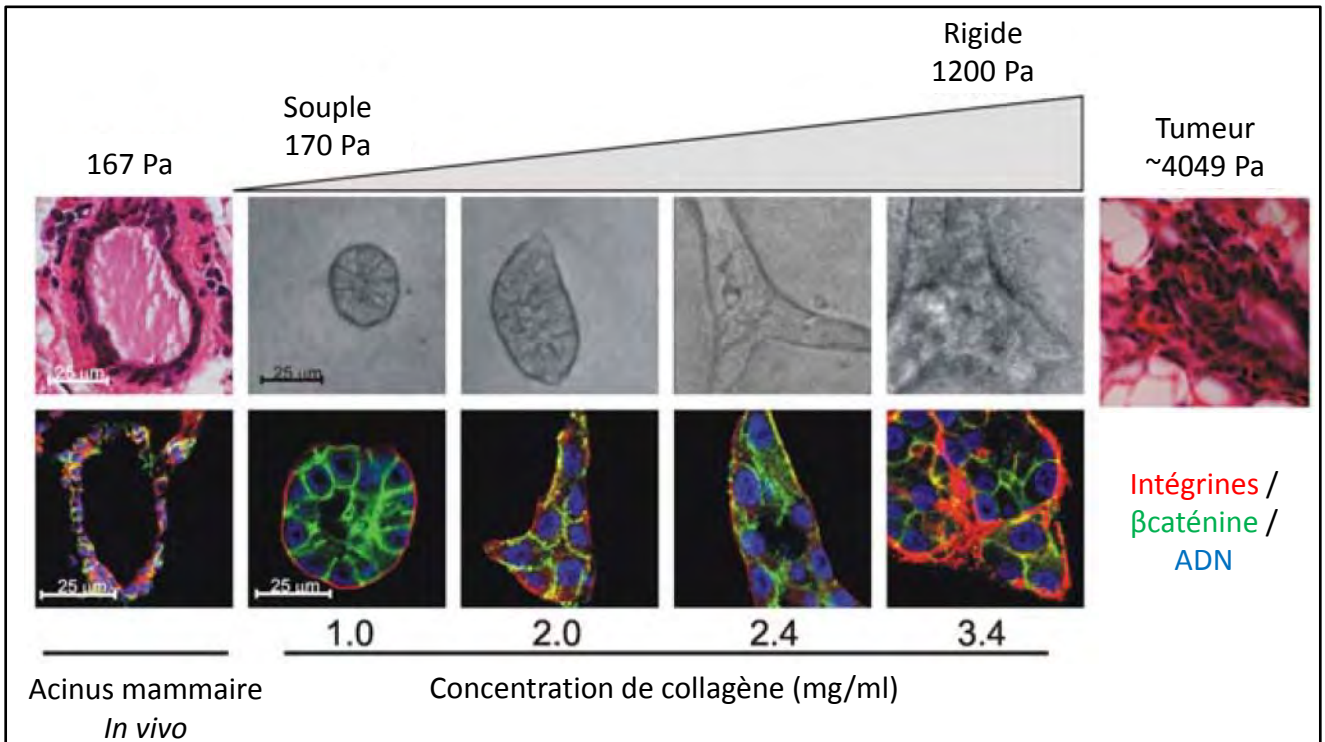


Figure 17 : Perte de la mécanoréceptivité dans les tissus tumoraux

En haut à gauche : Image d'une coupe de tissu mammaire coloré à l'Hémalun-Eosine, qui montre une morphologie typique d'un canal mammaire dans une glande mammaire souple (167 Pa). En haut au milieu : Images en lumière transmise de cellules épithéliales mammaires cultivées dans des gel contenant du collagène à des concentration croissantes (de 1 à 3,4 mg/ml), et donc à des rigidités croissantes (de 170 à 1200 Pa). En haut à droite : Image d'une coupe de tumeur mammaire colorée à l'Hémalun-Eosine, qui montre une morphologie désorganisée associée à une rigidité augmentée (4049 Pa). En bas : Images en fluorescence de section de tissu mammaire et de colonies cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut, marquées pour les intégrines (rouge), les βCaténines (vert) et l'ADN (bleu). Au fur et à mesure que la rigidité de la matrice extracellulaire augmente, l'organisation des cellules en acini est perdue.

Figure extraite de Paszek *et al.* (2005).

prometteuse. Le Verteporfin, qui inhibe la transcription induite par le complexe YAP/TEAD permet de limiter la surcroissance hépatique induite par une surexpression de YAP chez des animaux, sans induire d'effets adverses sur les autres organes [110]. L'inhibition de Rho et du cytosquelette d'actomyosine induisent également une diminution dramatique de l'activation de YAP/TAZ [105, 111].

e) La perte de la mécanoréciprocité et le développement tumoral.

La troisième loi de Newton [112] statue que pour chaque action, il existe une réaction égale et opposée ; c'est-à-dire que les actions de deux corps l'un sur l'autre sont toujours égales, dans des directions contraires. Cette loi universelle vaut en partie pour les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire. Les cellules ajustent leur tension intracellulaire en réponse aux modifications des propriétés mécaniques de la matrice. Inversement, la matrice extracellulaire sécrétée localement par les cellules, subit des modifications d'organisation dépendantes des changements des tensions cellulaires. Mais au-delà de la capacité d'adaptation et de maintien des tensions au sein d'un tissu, les cellules sont capables d'exercer des forces variables sur leur environnement, par exemple pour le modifier, ainsi que de répondre à une force extérieure, par exemple exercée par des cellules voisines. Ce processus est communément appelé mécanoréciprocité. Il est nécessaire, entre autres, au bon déroulement du développement de l'organisme, à l'adaptation de fonction des organes, aux réparations des lésions subies par l'organisme.

Cette mécanoréciprocité, en parfaite homéostasie dans les tissus sains, est perdue dans les tissus tumoraux [66]. Il en résulte une réponse inappropriée des cellules à leur environnement mécanique. Les travaux du groupe de V.M. Weaver [33] illustrent et décrivent parfaitement un des aspects de cette perte de la mécanoréciprocité. Ils s'appuient sur des modèles de cellules cultivées dans des gels de collagène ou de polyacrylamide de rigidités différentes. Dans une matrice de rigidité égale à celle des tissus mammaires, les cellules mammaires non transformées s'organisent en petits acini et arrêtent leur prolifération. Une faible augmentation de la rigidité de la matrice suffit à augmenter la prolifération des cellules induites par la présence de facteur de croissance, et s'accompagne de la désorganisation de l'acinus (**Figure 17**). La rigidité de la matrice entraîne une augmentation de la tension du cytosquelette d'actomyosine qui induit le regroupement et l'activation des intégrines au

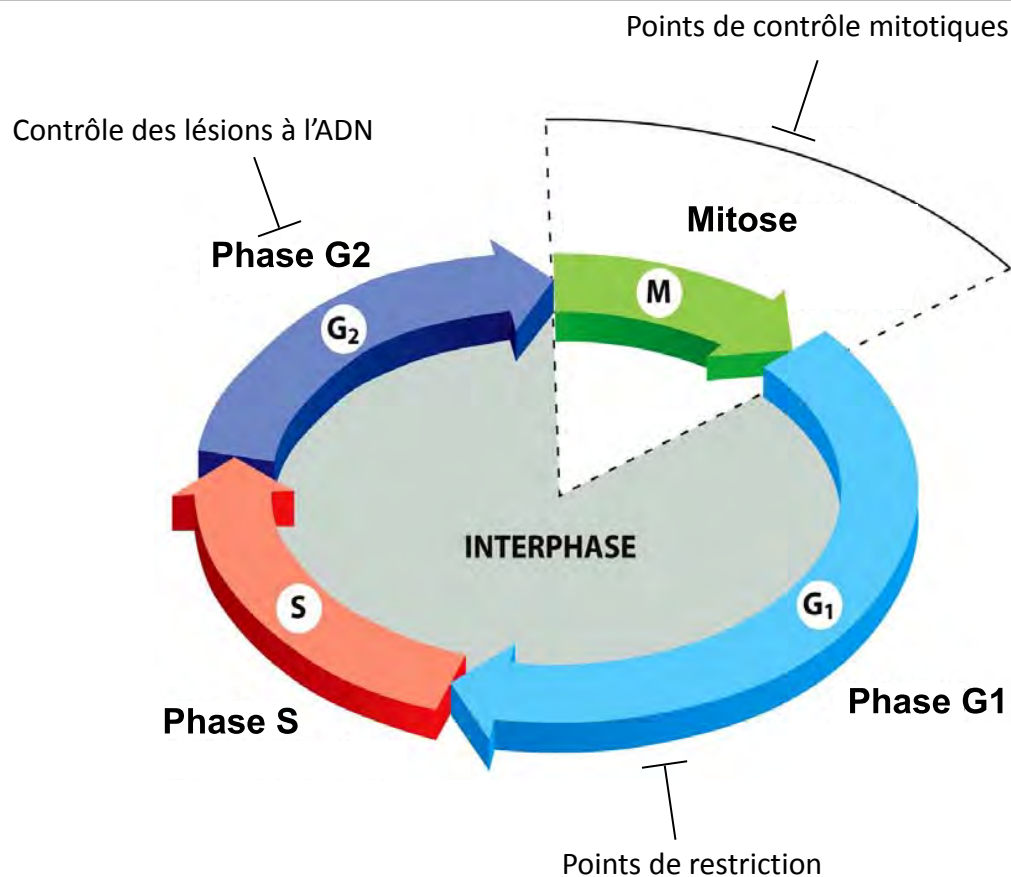


Figure 18 : Le cycle cellulaire et ses points de contrôle

Le cycle cellulaire est le processus par lequel une cellule mère donne deux cellules filles. Il se divise en 4 phases, donc les phases G₁, S et G₂ déterminent l'interphase. La phase G₁ est généralement la plus longue. Si les nutriments font défaut ou si les cellules reçoivent un stimulus antiprolifératif, les cellules ne passent pas le point de restriction. Une fois ce point dépassé, les cellules deviennent indépendantes des signaux mitogéniques. La phase S est la phase au cours de laquelle l'ADN est répliqué. Au cours de la phase G₂, les cellules réparent leur ADN s'il a subi des dommages, et se préparent à la mitose. Les points de contrôle correspondent à des voies biochimiques qui régulent les différentes transitions clés du cycle cellulaire, en réponse à la physiologie et à l'environnement de la cellule.

niveau de points focaux d'adhésion, d'où la phosphorylation de FAK. Ces phénomènes permettent d'augmenter la prolifération en réponse aux facteurs de croissance. La culture de cellules mammaires transformées conduit systématiquement à une prolifération augmentée et une désorganisation multicellulaire. Ces cellules sont hyper contractiles et forment d'abondants points focaux d'adhésion qui augmentent la réponse aux facteurs de croissance. Elles présentent une mécanoréciprocité altérée et n'ajustent pas leur comportement à leur microenvironnement. L'inhibition d'un des éléments de transmission entre les intégrines et l'augmentation de la prolifération suffit à rétablir une mécanoréciprocité normale, et à renverser le phénotype tumoral en induisant une diminution de la prolifération des cellules tumorales qui s'organisent à nouveau en acini.

La perte de la mécanoréciprocité n'est pas la cause exclusive de l'apparition d'un cancer. Une dérégulation du cycle cellulaire, des défauts de réparations des dommages à l'ADN, la résistance à l'apoptose, une migration altérée sont autant de caractéristiques majeures de l'apparition et de l'évolution tumorale. Une des étapes clés du cycle cellulaire est la phase de mitose, dont le déroulement peut être anormal dans les cellules tumorales et conduire à une instabilité génétique. Les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire contrôlent directement le déroulement de la mitose.

4) La division cellulaire

a) Présentation générale du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques (**Figure 18**). On le décompose classiquement en deux grandes étapes : l'interphase et la mitose.

i. Les différentes phases du cycle cellulaire

L'interphase est la période du cycle cellulaire au cours de laquelle les cellules croissent et répliquent leur ADN. Elle est divisée en trois étapes successives (**Figure 18**). La phase G1 permet à la cellule de se préparer à progresser dans le cycle cellulaire. Elle double son contenu cellulaire et vérifie l'intégrité de son génome. Après la phase G1, les cellules entrent en phase S, au cours de laquelle elles répliquent leur ADN. Les cellules passent ensuite par

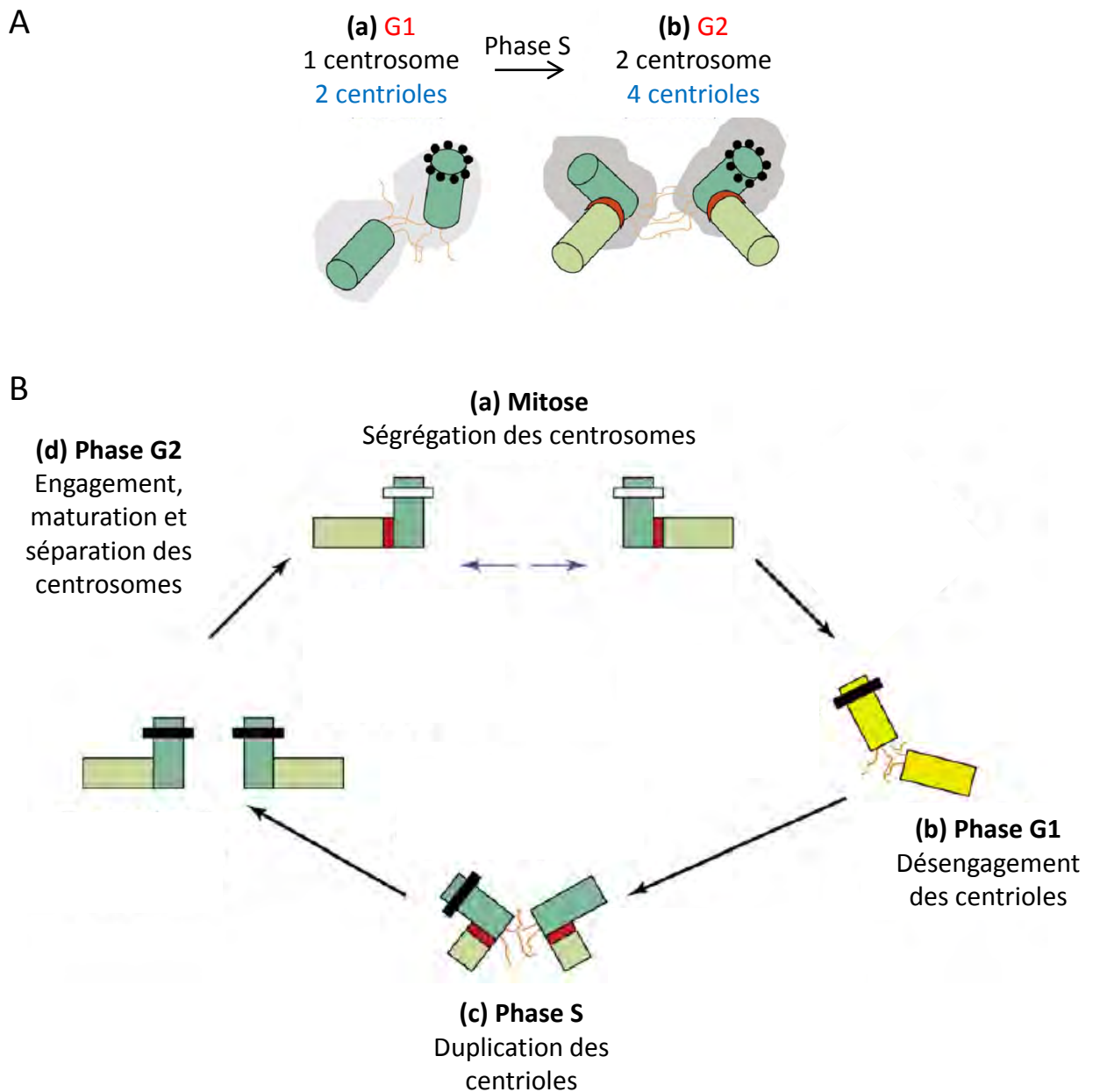


Figure 19 : Les centrosomes et leur duplication

(A-B) Durant la phase G1 (Aa et Bb), les cellules contiennent un seul centrosome comprenant deux centrioles distincts structurellement. Les centrioles sont entourés de matériel péri-centriolaire. Leur attachement est lâche. Durant la phase S (Bc), les centrioles se dupliquent et les cellules en G2 contiennent deux centrosomes, chacun comportant deux centrioles solidement associés perpendiculairement (Ab et Bd). Le matériel peri-centriolaire subit également une maturation qui facilite le recrutement des protéines de nucléation des microtubules requis pour la formation du fuseau mitotique. Durant la mitose (Ba), les centrosomes se séparent et forment chacun un des pôles du fuseau.

Figures extraites de Nigg *et al.* (2007)

une deuxième phase nommée G2 qui leur permet de corriger les éventuels dommages à l'ADN. Puis vient l'étape de mitose, la période pendant laquelle les cellules séparent leur contenu génétique et cellulaire en deux cellules filles distinctes. La mitose, sur laquelle porte essentiellement les travaux réalisés au cours de cette thèse, est détaillée spécifiquement dans le sous-chapitre suivant.

ii. La progression dans le cycle cellulaire est contrôlée

Au cours de la progression dans le cycle cellulaire des mécanismes de surveillance sont mis en place par la cellule pour vérifier que tous les éléments essentiels à la progression du cycle cellulaire sont présents et fonctionnels à une étape donnée, et qui permettent le maintien de l'intégrité du génome. Ces mécanismes de surveillance sont des points de contrôle qui modulent la progression des cellules dans le cycle cellulaire, en réponse à des signaux intracellulaires, ou environnementaux (**Figure 18**). Ils sont mis en place aux différentes transitions clés afin qu'une cellule ne puisse poursuivre son cycle si les phases précédentes ne se sont pas correctement achevées ou si des lésions de l'ADN sont détectées.

iii. La duplication des centrosomes

De façon synchrone au cycle cellulaire, un cycle de duplication des centrosomes permet à la cellule de mettre en place les centres organisateurs de microtubules dont le rôle est crucial dans l'organisation du fuseau mitotique. Chaque centrosome mature comporte deux centrioles entourés d'une matrice protéique constituée de plus d'une centaine d'autres composants dont les fonctions ne sont pas toutes élucidées à ce jour. Le cycle de duplication des centrosomes doit être finement régulé pour assurer la formation d'un fuseau mitotique bipolaire garant de la ségrégation correcte des chromosomes. Les centrioles nécessitent d'être dupliqués une fois seulement au cours du cycle cellulaire (**Figure 19**). En G1, les deux centrioles sont reliés par une structure dynamique qui permet la duplication. Les deux centrioles se séparent en début de phase S, un centriole fils est assemblé au centriole père. Cette conformation dite « d'engagement », pourrait empêcher une nouvelle duplication au cours du même cycle cellulaire [113]. En G2, après pleine maturation des centrioles, les deux nouveaux centrosomes formés se séparent et participent à la mise en place d'un fuseau bipolaire. En cas de défaut du nombre de centrosomes, la division peut être mono ou multipolaire. La fidélité de ségrégation des chromosomes est compromise.

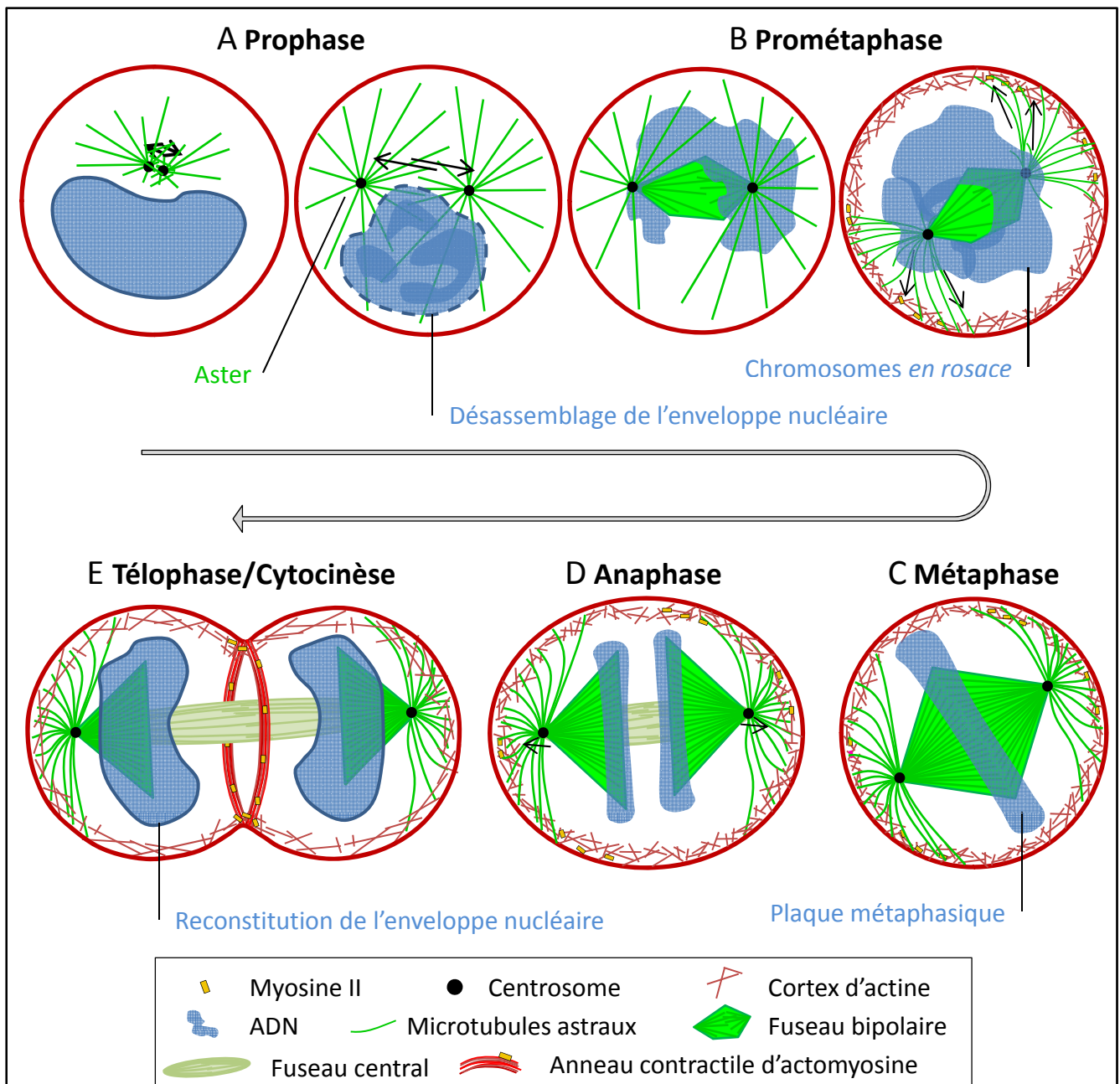


Figure 20 : Les étapes de la mitose

(A) En prophase, la cellule mitotique s'arrondit et possède deux centrosomes qui commencent à s'éloigner grâce aux forces antagonistes des microtubules. L'enveloppe nucléaire commence à se désassembler et les chromosomes à se condenser au passage en prométaphase (B). L'éloignement des centrosomes se poursuit par l'action conjointes des microtubules qui constitueront le fuseau mitotique, et par l'ancrage des microtubules astraux au cortex d'actine contractile. Les chromosomes s'organisent en rosace autour de la zone riche en microtubules. Un à un, les kinétochores des chromosomes sont capturés par les microtubules. Le fuseau bipolaire et la plaque métaphasique se forment (C). Lorsque tous les chromosomes sont correctement accrochés aux microtubules et alignés sur la plaque métaphasique, les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles (D). Un fuseau central de microtubules dont les extrémités se superposent persiste et déterminera la position de l'anneau contractile d'actine. Les chromosomes se décondensent pendant la télaphase (E). La cytokinèse est l'étape de séparation des deux cellules filles, par la création d'un sillon de clivage grâce à l'anneau contractile d'actine. La machinerie d'abscision permet la séparation complète des deux cellules filles.

b) La mitose

La mitose comporte cinq phases distinctes (**Figure 20**). Brièvement, les chromosomes se condensent et les centrosomes se séparent en prophase (**Figure 20A**). Le désassemblage de l'enveloppe nucléaire signe l'entrée en prométaphase (**Figure 20B**), au cours de laquelle les centrosomes poursuivent leur éloignement et le fuseau mitotique s'établit. Lorsque tous les chromosomes sont correctement associés aux microtubules et positionnés sur la plaque équatoriale, la cellule est en métaphase (**Figure 20C**). L'attachement correct de tous les chromosomes induit l'activation d'acteurs moléculaires et le passage en anaphase, avec la séparation des deux lots de chromatides sœurs qui vont être respectivement attirées vers chaque pôle de la cellule par les microtubules (**Figure 20D**). Tandis que les chromatides se rapprochent des pôles, l'enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque lot de chromosomes. La cellule est alors en télophase (**Figure 20E**). Cette étape s'accompagne de l'établissement d'un anneau contractile d'actine et de myosine à mi-distance entre les pôles. Il provoque une constriction de la membrane plasmique au cours d'un phénomène appelé cytokinèse (**Figure 20E et 24**). La machinerie d'abscission prend le relais pour achever la séparation physique des deux cellules filles en rompant la continuité membranaire. Nous allons maintenant voir plus en détail chacune des étapes de la mitose.

i. De la prophase à la pro-métaphase

En prophase (**Figure 20A**), la cellule s'arrondit et la chromatine se condense. Le réseau interphasique des longs microtubules qui émanent des centrosomes est progressivement converti en deux arrangements radiaux de microtubules entourant les centrioles, nommés asters. Les forces antagonistes des microtubules permettent la séparation des centrosomes, qui entament chacun la nucléation d'un pôle du fuseau. La prophase s'achève avec le désassemblage de l'enveloppe nucléaire.

Au cours de la prométaphase (**Figure 20B**) l'éloignement des centrosomes se poursuit, le réseau bipolaire de microtubules se met en place. Les chromosomes s'organisent tout autour de cette zone dense en microtubules en une configuration définie comme étant *en rosace*. Cette organisation en rosace est mise en place grâce à un ensemble de forces d'éjection provenant des microtubules polaires, appelée force d'éjection polaire [114], et une combinaison d'interactions latérales labiles entre les kinétochores et les microtubules.

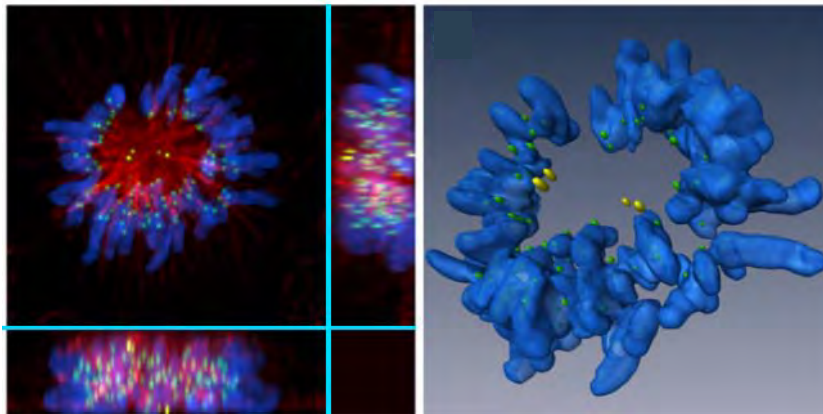


Figure 21 : Conformation chromosomique en rosace

Gauche : Images d'une cellule RPE1 en prométophase fixée et dont les chromosomes sont marqués en bleu (DAPI), les centrioles en jaune, les kinétochores en vert et les microtubules en rouge. Les chromosomes ont pris une conformation en rosace, avec leur kinétochores tournés vers le centre riche en microtubules et leur bras expulsés vers l'extérieur. Droite : Représentation de l'image de gauche avec des surfaces générées par ordinateur qui permettent de donner une visualisation 3D des chromosomes (bleu), des kinétochores (vert) et des centrioles (jaune).

Figure extraite de Magidson *et al.* (2011).

Les kinétochores sont des structures localisées sur les faces opposées des chromosomes et tendent à être reliés par des microtubules à chacun des deux pôles opposés. Des modèles mathématiques ont démontré que si les chromosomes sont aléatoirement placés dans la cellule, leur capture par les microtubules serait impossible à effectuer dans le temps imparti de la prométaphase [115]. L'organisation des chromosomes en rosace aurait donc pour rôle de faciliter l'assemblage du fuseau mitotique [116]. Les chromosomes se retrouvent positionnés avec leur centromère localisé au niveau équatorial avec les kinétochores exposés vers la zone centrale dense en microtubules, les bras des chromosomes sont expulsés vers l'extérieur, ce qui permet la capture rapide et stable des kinétochores par les microtubules (**Figure 21**). Lorsque les deux kinétochores des chromosomes sont associés de façon stable aux microtubules provenant des pôles opposés, les chromosomes sont ramenés à mi-distance entre les pôles.

Pour un établissement du fuseau mitotique parfait, les centrosomes doivent poursuivre leur éloignement et stabiliser leur position. Les microtubules astraux qui émanent des centrosomes établissent des contacts avec le cortex d'actine. Les mouvements du cortex d'actine induit par l'activité de la myosine II entraînent avec eux les microtubules astraux et les centrosomes. La présence de facteurs de polarités participe également à la régulation de la position des centrosomes [117, 118]. La stabilisation de l'ancrage et de la taille des microtubules astraux permet de maintenir la position des pôles du fuseau à la métaphase. Les chromosomes recrutés par les microtubules kinétochoriaux se positionnent alors sur le plan équatorial de la cellule et établissent la plaque métaphasique.

ii. La métaphase et le point de contrôle mitotique

Lorsque tous les chromosomes ont un attachement bipolaire et sont localisés à mi-distance entre les deux pôles, la cellule est dite en métaphase (**Figure 20C**). Le regroupement des chromosomes en un cylindre fin et homogène est appelé plaque métaphasique.

Le point de contrôle mitotique, ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), se met en place au cours de la transition métaphase-anaphase. Il permet la vérification de l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique, et empêche la cellule de progresser en anaphase tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement capturés et alignés en une plaquemétaphasique [119, 120] (**Figure 22**). Ce mécanisme de contrôle couple les

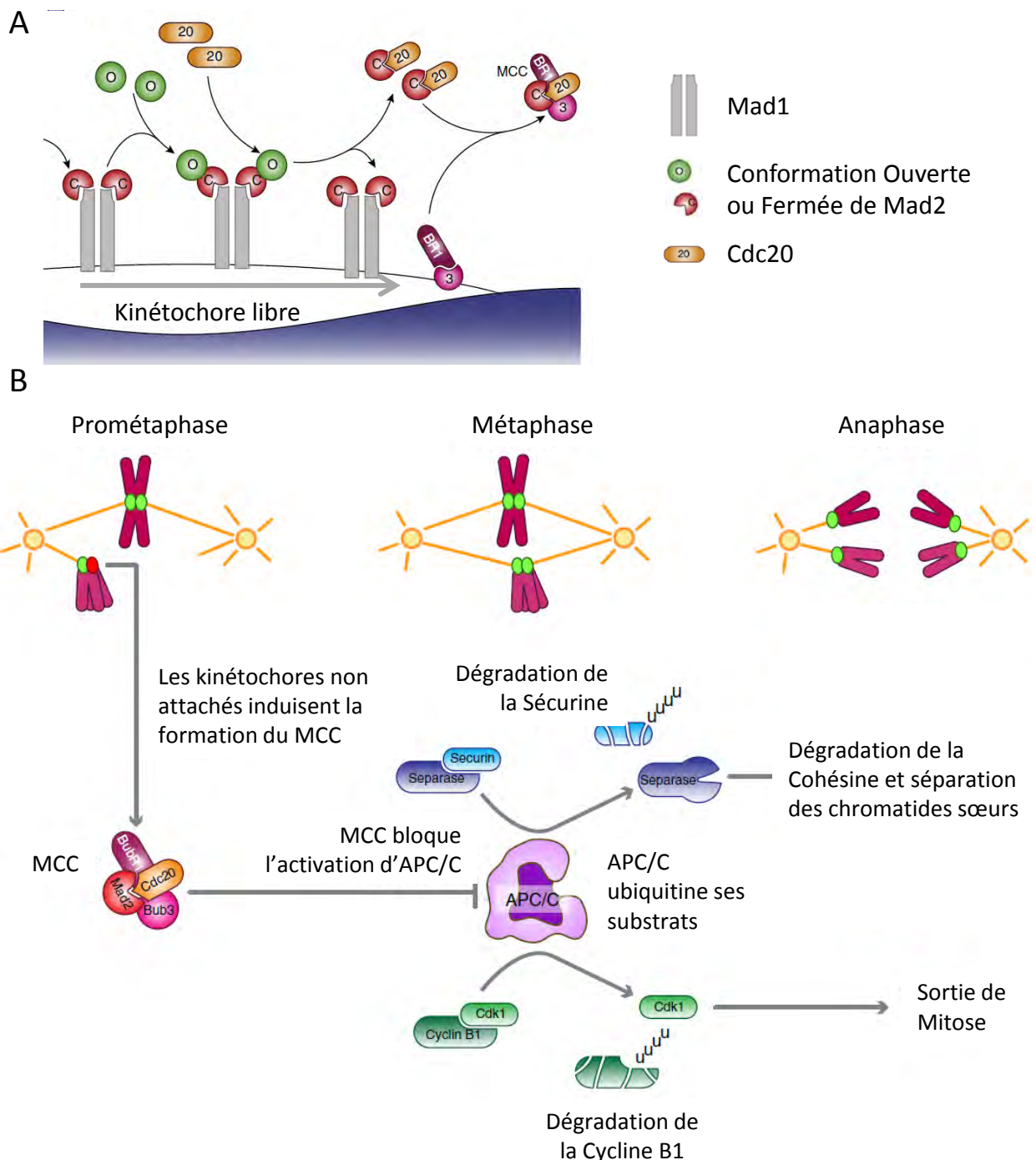


Figure 22 : Le point de contrôle mitotique

(A) Mad1 se localise au niveau des kinétochores détachés. La liaison de Mad2 à Mad1 modifie sa conformation ouverte (O) en conformation fermée (C, closed). Le changement de conformation de Mad2 est amplifié par le recrutement de O-Mad2 et de Cdc20 au niveau des kinétochores. Les complexes C-Mad2-Cdc20 produit vont s'associer à BubR1 (BR1) et à Bub3 (3) pour former le complexe de contrôle mitotique (Mitotic Checkpoint Complex MCC).

(B) En prométaphase, la présence de kinétochores non attachés induit la formation de MCC. Ce complexe inhibe APC/C. Une fois que les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique avec leur kinétochores accrochés aux microtubules, le MCC se dissocie, et Cdc20 libéré peut se lier à APC/C pour induire l'ubiquitination et la dégradation de la Sécurine. La Séparase est libérée et induit la dégradation de la Cohésine. Ceci entraîne la séparation des chromatides sœurs et l'anaphase. Parallèlement, l'APC/C dégrade la Cycline B1, qui conduit vers la sortie de mitose.

Figure extraite de Lara-Gonzalez *et al.* (2012).

kinétochores non-attachés à l'APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*), le complexe protéique responsable de l'achèvement de la mitose.

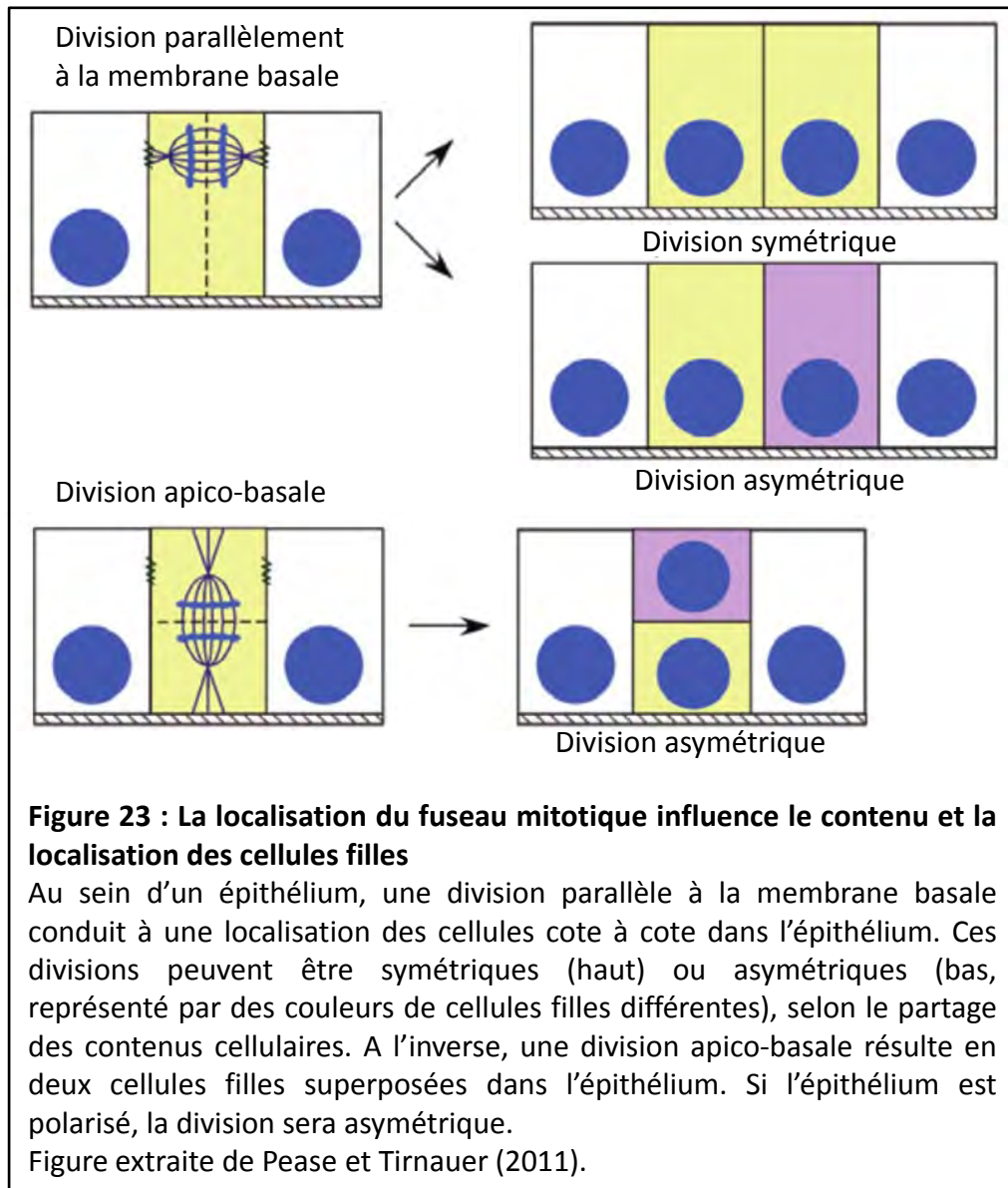
La protéine motrice de la famille des kinésines, CENP-E (*Centromere-associated protein E*), s'associe aux kinétochores et à une autre kinase, BubR1 (*Bub-related kinase-1*), pendant la prométaphase et sert de détecteur de tension. BubR1 régule l'activité de Mad1 (*Mitotic Arrest Deficient1*) qui à son tour régule les fonctions de la protéine Mad2 (*Mitotic Arrest Deficient2*). La liaison de Mad1 à Mad2 induit le changement de sa conformation ouverte vers une conformation fermée [121]. En conformation fermée, Mad2 a pour propriété principale de séquestrer Cdc20 (*Cell-Division Cycle 20*), la sous-unité adaptatrice de l'APC, rendant l'APC/C inactif, inhibant ainsi la transition métaphase/anaphase [122]. En prométaphase, BubR1 et Mad2 se lient à tous les kinétochores et séquestrent Cdc20. Les chromosomes s'attachent au fuseau bipolaire et libèrent un à un les signaux inhibiteurs de la progression en anaphase. Dès que tous les kinétochores sont attachés correctement aux microtubules, Cdc20 est libéré de Mad2, et peut donc activer l'APC/C (**Figure 22**) pour permettre la progression en mitose.

Un deuxième point de contrôle mitotique dépendant de la protéine Chfr (*Checkpoint with FHA and Ring finger domain*) a également été identifié. Il interviendrait en prophase où la protéine Chfr serait impliquée dans un arrêt précoce en réponse à l'exposition à un stress mitotique tel qu'une exposition à des poisons des microtubules comme le nocodazole ou le taxol [123, 124].

iii. L'orientation de l'axe de division

La localisation et l'orientation du fuseau mitotique déterminent l'orientation de l'axe de division. Perpendiculairement à cet axe se situera le plan de clivage, qui déterminera le contenu cellulaire et la localisation respective des deux cellules filles. La localisation et l'orientation du fuseau mitotique dépendent eux-mêmes de la localisation respective des centrosomes.

La détermination de la localisation et de l'orientation de l'axe de division est très importante car elle impactera directement sur le devenir des cellules filles et sur la maintenance tissulaire.



Si le fuseau se trouve excentré dans la cellule, il peut en résulter à l'issue de la division deux cellules filles de tailles différentes qui n'auront pas le même contenu cellulaire et auront des destins différents.

Une division symétrique correspond à une division de la cellule mère dont le contenu cellulaire et génétique a été partagé équitablement mais arbitrairement entre les cellules filles. Elles sont alors identiques. Les divisions peuvent être asymétriques lorsqu'elles sont guidées par une polarité de la cellule mère. Les divisions asymétriques existent fréquemment au sein des épithéliums (**Figure 23**, [125]). Dans un épithélium, les cellules ont un pôle basal et un pôle apical, qui ne contiennent pas les mêmes composants cellulaires. En se divisant selon l'axe apico-basal, la cellule fille supérieure sera plus riche en composants apicaux et la cellule inférieure en composants basaux. Une division asymétrique peut également se manifester par une distribution des chromosomes contrôlée. Par exemple, la cellule qui restera au contact de la membrane basale conservera les brins d'ADN non répliqués à la phase S précédente [126]. De la même façon que dans l'exemple précédent, les deux cellules filles n'auront pas le même destin. Au sein d'un épithélium, la cellule basale reste souvent indifférenciée et participe au renouvellement des cellules du tissu, la cellule apicale se différencie pour participer aux fonctions du tissu.

Ainsi au sein d'un épithélium, l'axe de division peut être orienté dans le sens apico-basal, mais il peut aussi être orienté parallèlement à l'épithélium. Sous cette configuration, la division peut également être symétrique ou asymétrique. Il en résulte une différence de positionnement relatif des cellules filles dans le tissu. Lors d'une division orientée parallèlement à l'épithélium, les deux cellules filles seront côte à côte, et non plus superposées.

Le positionnement de l'axe de division au moment de la mitose impacte fortement sur le destin des cellules filles, et par conséquent sur l'organisation tissulaire. C'est un élément essentiel de l'homéostasie tissulaire finement contrôlée. Des dérégulations du positionnement de l'axe de division sont impliquées dans différentes situations physiopathologiques.

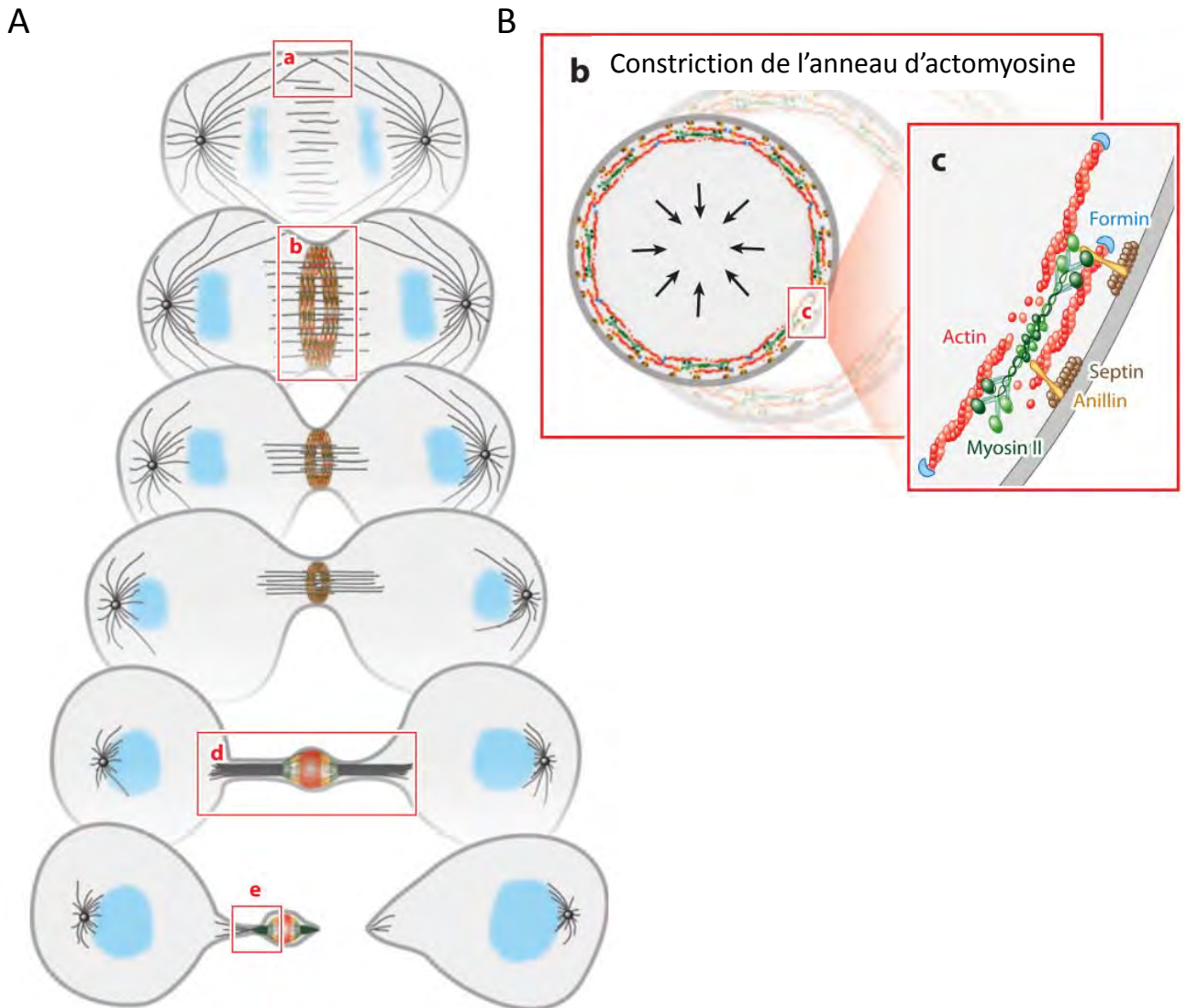


Figure 24 : Le processus de la cytokinèse

(A) Schéma illustrant le processus de cytokinèse. Un signal provenant du fuseau mitotique et du cortex génère l'activation de RhoA au niveau de la zone équatoriale (a). RhoA induit la création du fuseau central, une zone riche en microtubules provenant des pôles dont les extrémités se superposent. RhoA induit également l'assemblage d'un anneau contractile d'actomyosine (b), qui est accroché à la membrane plasmique. La constriction de l'anneau entraîne la membrane et crée un sillon de clivage. Parallèlement, le fuseau central mature pour devenir un midbody (d), qui organise le pont intercellulaire. Lorsque les deux membranes de part et d'autre du fuseau sont proche, l'anneau contractile se dissout et la machinerie d'abscission (e) prend le relai pour terminer la séparation physique des deux cellules.

(B) Agrandissement de l'anneau contractile (b) et de sa liaison à la membrane (c). L'anneau contractile est un réseau de filaments d'actine auxquels la myosine II s'associe. Ce cytosquelette d'actomyosine est attaché à la membrane plasmique par les biais des protéines de la membrane, les Septines et de les protéines d'assemblage des filaments, l'Anilline.

Figure extraite de Green *et al.* (2012).

iv. De l'anaphase à la cytokinèse

Depuis la réplication et jusqu'à la métaphase, les deux chromatides, restent associées grâce à des complexes protéiques nommées cohésines. Cette cohésine est protégée de la dégradation par la séparase séquestrée par la sécurine. Lorsque le SAC est levé, l'APC/C est libéré et redevient actif, l'anaphase peut avoir lieu (**Figure 20D**). L'APC/C détruit la sécurine, ce qui conduit à la libération de l'enzyme séparase qui dégradera la cohésine permettant la séparation des chromatides pour leur ascension polaire opposée (**Figure 22B**). La séparation des chromosomes ne provient pas d'une force de traction exercée par les microtubules sur les kinétochores, elle est régulée par les chromosomes eux-mêmes. Le maintien de l'activité des protéines motrices et la réduction de la longueur des microtubules kinétochoriaux participent à l'éloignement des chromosomes en direction des pôles auxquels ils sont attachés. Ce mouvement ordonné des chromatides sœurs s'accompagne d'une elongation du fuseau. Cet allongement provient de l'éloignement des demi-fuseaux, et de la mobilité des pôles eux-mêmes. Les microtubules se réorganisent en un fuseau central. Au cours de la télophase (**Figure 20E**), l'enveloppe nucléaire se reforme autour des lots de chromatides sœurs. Un anneau très fin de filaments d'actine associés à la membrane plasmique se met en place. La localisation de l'anneau contractile est contrôlée par les microtubules du fuseau central, qui spécifient la position de l'anneau à mi-distance des deux pôles du fuseau et perpendiculairement à son axe longitudinal.

Au cours de la cytokinèse (**Figure 22E**), la myosine II permet la constriction de l'anneau en faisant glisser les filaments d'actine les uns par rapport aux autres. L'interaction des filaments d'actine avec la membrane plasmique entraîne cette dernière dans le mouvement induit par la myosine II. Etant donné que l'anneau est confiné à une bande étroite du cortex, il forme un sillon de clivage qui conduit à une constriction locale de la membrane. Quand ne subsiste qu'un étroit pont cytoplasmique entre les deux cellules, l'anneau contractile se désassemble et la machinerie d'abscision recrutée sépare les deux cellules filles par un mécanisme de fission [127, 128] (**Figure 24**).

5) Les contraintes mécaniques ont un rôle dans le contrôle de la mitose

a) Impact des contraintes mécaniques sur la progression en mitose

Quelques rares études ont été menées ces dernières années sur l'effet du confinement sur le déroulement des mitoses. Le groupe de Di Carlo [129, 130] montre que le confinement des cellules induit un délai en mitose, une augmentation des divisions multipolaires et une augmentation de la mort cellulaire. Les groupes de M. Piel et B. Baum [131] prouvent que le manque d'espace empêche les cellules mitotiques de s'arrondir et d'établir correctement le fuseau mitotique. L'aplatissement des cellules induit une organisation des chromosomes incorrecte, qui les rendrait difficiles à capturer par les microtubules pour être alignés sur la plaque métaphasique. Au delà d'un certain confinement, la congression des chromosomes sur la plaque métaphasique n'aboutit pas et le point de contrôle mitotique reste activé. Les cellules divisent finalement un de leurs pôles en deux pour mener une division multipolaire. Itabashi *et al.* [132] expliquent que les contraintes environnementales se répercutent sur un fuseau mitotique déjà établi, sur les tensions au niveau des centromères et sur la durée de la transition métaphase-anaphase. Leurs travaux précisent toutefois que ces impacts sont dépendants de l'orientation, de l'amplitude et de la fréquence d'application de la contrainte mécanique sur les cellules en mitose. Par exemple, une contrainte mécanique appliquée perpendiculairement au fuseau mitotique réduit davantage la durée de la transition métaphase-anaphase qu'une contrainte appliquée parallèlement au fuseau, cet effet est amplifié par une amplitude de contrainte augmentée.

La critique principale que l'on peut faire sur ces études est qu'elles ont toutes été réalisées sur des cellules uniques, extrêmement confinées dans des espaces de 3 à 5 μm de haut. Cet environnement est très peu représentatif de ce qui existe dans l'environnement *in vivo*, et omet totalement la dimension multicellulaire des tissus.

b) Impact des contraintes mécaniques sur la détermination de l'axe de division

Lorsque les cellules sont cultivées en deux dimensions, le fuseau mitotique est généralement centré dans la cellule. L'axe de division est orienté dans le sens de l'axe le plus long de la cellule [133] parallèlement au substrat [134]. En déformant les cellules mitotiques avec une

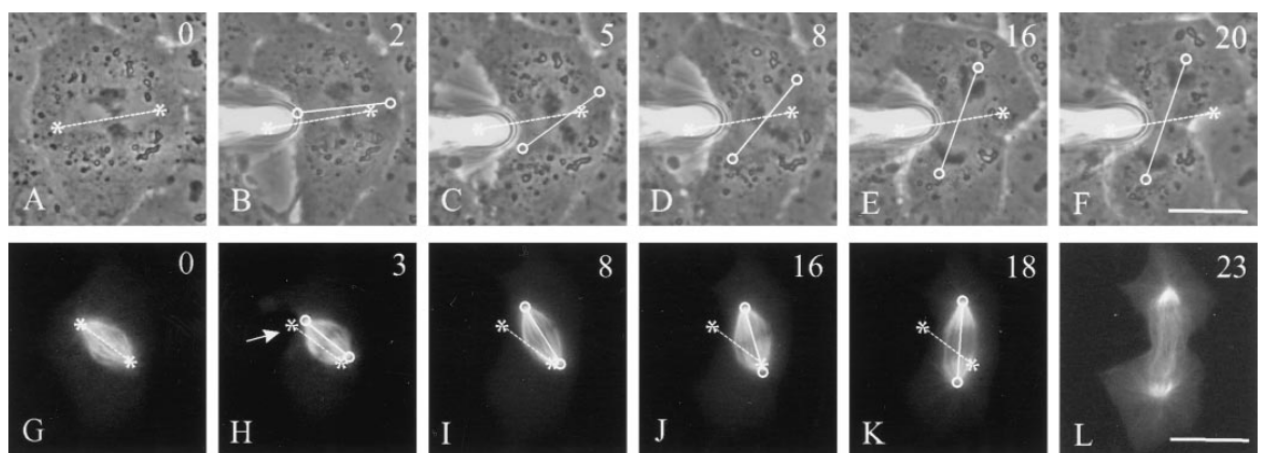


Figure 25 : Rotation du fuseau mitotique d'une cellule manipulée mécaniquement

Haut : Images en contraste de phase d'une cellule NRK. Bas : Image en fluorescence d'une autre cellule injectée avec de la Rhodamine afin de repérer le fuseau mitotique. Une aiguille est placée contre la membrane plasmique de chacune des cellules et est utilisée pour déformer le cortex. Rapidement, le fuseau mitotique se réoriente selon l'axe le plus long de la cellule. Les lignes en pointillé qui joints les étoiles correspondent à l'orientation du fuseau mitotique avant déformation mécanique, et la ligne pleine qui joint les cercles correspond à la position finale du fuseau mitotique.

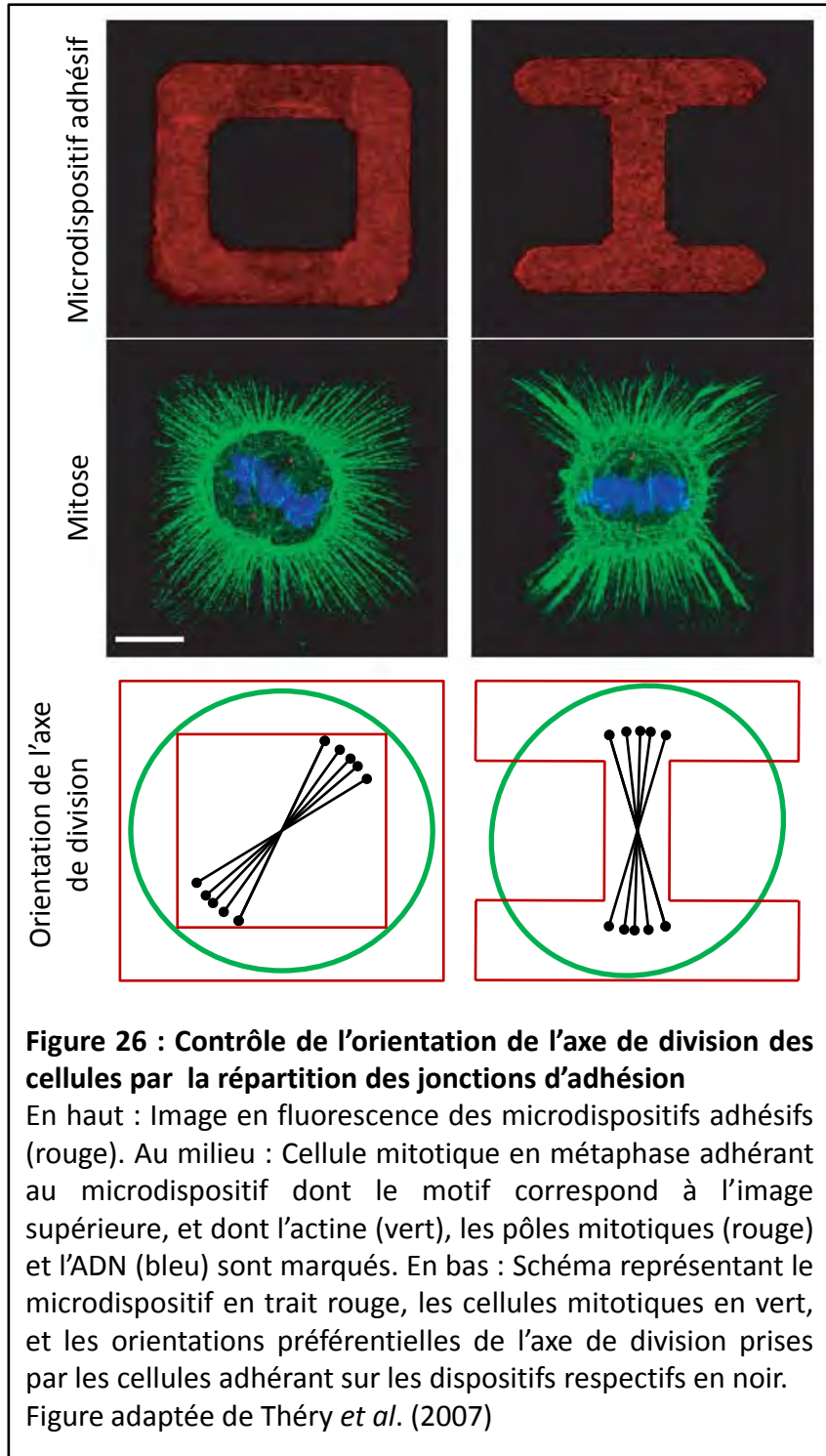
Figure extraite de O'Connell *et al.* (2000).

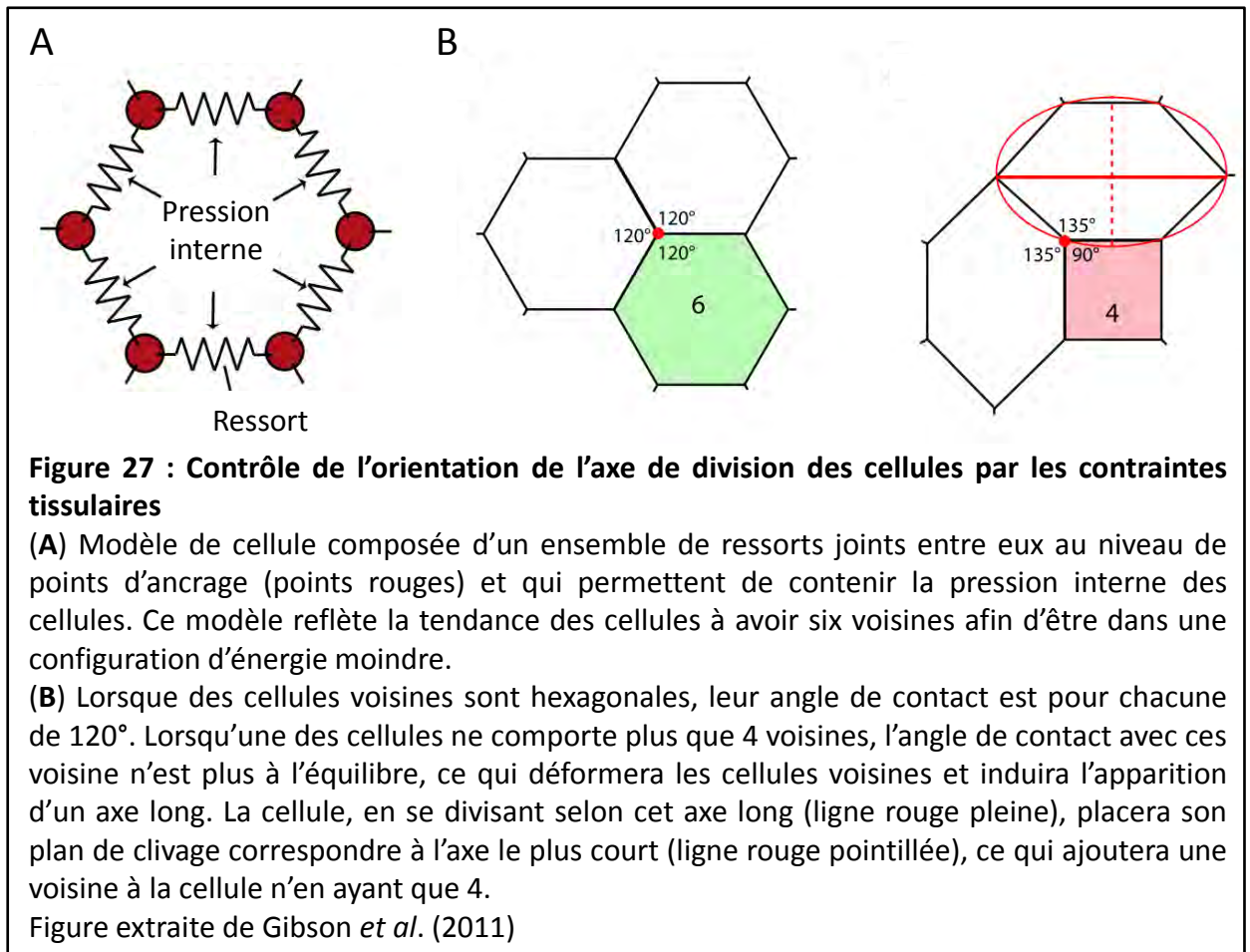
aiguille, O'Connell et Wang [135] montrent qu'elles sont capables de réorienter, en cours de mitose, leur axe de division en fonction des déformations qu'elles subissent pour qu'il soit à nouveau dans le sens de l'axe le plus long de la cellule (**Figure 25**). Cette réorientation préférentielle est inhibée par l'interruption des interactions entre les microtubules et le cortex d'actine.

Dans une autre étude, Fernandez *et al.* [136] ont appliqué des forces de cisaillement sur des cellules mitotiques non adhérentes, comprimées entre deux plaques de verre dont l'une est déplacée par rapport à l'autre. Les cellules s'allongent et les divisions s'orientent perpendiculairement à l'axe du cisaillement. Ses forces de cisaillement induisent une relocalisation de la myosine II aux pôles de la cellule allongée qui participe à l'orientation de l'axe de division. Celle-ci est directement contrôlée par les forces perçues par les cellules. Des résultats similaires avaient été obtenus par le groupe de A.R. Bausch [137]. Ces deux études ont également montré, par des expériences d'inhibition pharmacologique du cytosquelette d'actomyosine, que son intégrité fonctionnelle est nécessaire à l'orientation dépendante des mouvements des substrats en contact avec les cellules.

Toyoshima et Nishida [134] ont apporté la preuve que l'orientation de l'axe de division de cellules non polarisées est dépendante de l'adhésion cellule-matrice transmise par les intégrines. Reverte *et al.* (2006) avaient déjà démontré l'importance de l'adhésion dans la mise en place du fuseau mitotique lui-même, ce qui peut interférer avec son positionnement. Toutefois, Toyoshima et Nishida montrent que, dans des conditions de culture où l'environnement mécanique est constant au cours de la mitose, la contractilité de l'actine corticale par la myosine II n'est pas impliquée. Un positionnement correct nécessite toutefois un ancrage des microtubules au cortex d'actine. La contractilité de la myosine II est peut-être nécessaire à l'ajustement de l'orientation de la division, si l'environnement mécanique est modifié au cours de la mitose.

Théry *et al.* [138, 139] montrent de façon plus systématique l'impact de la distribution des adhésions cellule-substrat sur la forme cellulaire et l'orientation du fuseau mitotique. En faisant adhérer les cellules à des microdispositifs adhésifs de forme définie, ils contrôlent la distribution des jonctions cellules-matrices ainsi que la forme cellulaire. Ils observent que la





distribution des jonctions cellules-matrice contrôle la localisation des composants corticaux, et l'activité de l'actine en interphase. Cette organisation corticale est maintenue dans la cellule mitotique ronde, et participe effectivement à la détermination de l'orientation de l'axe de division (**Figure 26**). Elle est probablement transmise au corps de la cellule en division et au fuseau mitotique par des fibres de rétraction, facilitant l'ancrage au substrat tout au long de la division. La modification de leur distribution, par exemple par microablation laser, induit l'ajustement de l'orientation de l'axe de division de la cellule en conséquence [140].

Cependant, ces études ont été effectuées sur des cellules uniques et cultivées en deux dimensions. Or, les cellules sont rarement isolées les unes des autres, et les jonctions intercellulaires sont au moins aussi importantes que les jonctions cellule-matrice dans la régulation de l'orientation de l'axe de division. L'équipe de A.S. Yap [141] montre que l'inhibition de la E-Cadhérine induit un défaut d'orientation de l'axe de division de cellules. A une plus grande échelle, l'organisation cellulaire au sein d'un tissu influence la position de l'axe de division [142]. Au sein d'un épithélium, la distribution des formes cellulaires tend vers un équilibre de moindre énergie, obtenu quand les cellules sont hexagonales. En considérant la cellule comme un élément ayant une pression interne et une tension de surface données, Gibson *et al.* [142] démontrent par un modèle mathématique que la forme et l'orientation de l'axe longitudinal des cellules mitotiques dépend de la forme des cellules voisines (**Figure 27**). Dans ce modèle où les cellules se divisent selon leur axe longitudinal, le clivage se fait selon l'axe le plus court. Ce contrôle tissulaire du plan de clivage permet d'ajouter un bord à une cellule voisine qui en avait moins de six. Ce contrôle réciproque de la forme des cellules et du nombre des voisines participe à la régulation de la topologie cellulaire.

L'ensemble de ces études s'accordent donc à prouver que l'environnement tissulaire et mécanique joue un rôle majeur dans la régulation de l'orientation de l'axe de division qui met en jeu le lien entre actine corticale et organisation des centrosomes et des microtubules.

c) Défaut de positionnement de l'axe de division et développement tumoral

i. Implication d'un défaut d'orientation de l'axe de division dans l'initiation tumorale

Des défauts de contrôle du positionnement de l'axe de division des cellules ont été impliqués dans différentes pathologies neurologiques (microencéphalie, lissencéphalie) [143]. L'hypothèse que de tels défauts puissent également participer à l'initiation ou à l'invasion tumorale est souvent avancée dans la littérature [125]. Trois études montrent l'importance de la perte de l'asymétrie de division des cellules souches dans le développement tumoral. La division asymétrique des cellules souches conduit à la formation d'une cellule qui conserve le caractère souche et d'une cellule qui pourra s'engager dans le processus de différenciation, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie tissulaire. Un défaut du contrôle de la division des cellules souches peut conduire à un excès de la population proliférative par rapport à la population différenciée. Quyn *et al.* [126] montrent que la protéine APC, dont la mutation est généralement initiatrice des cancers colorectaux, participe à la corrélation entre l'orientation de l'axe de division et l'asymétrie de division des cellules souches des cryptes intestinales. Sa mutation entraîne un défaut d'orientation des divisions associé à une perte de l'asymétrie de division et une forme anormale des cryptes intestinales. Ces défauts pourraient participer au développement tumoral. Le groupe de P.G. Pelicci [144] et les travaux de Sugiarto *et al.* [145] démontrent que la perte de l'asymétrie de division des cellules souches est associée à une augmentation du potentiel prolifératif. Ils prouvent aussi que l'inhibition de la protéine oncosuppressive p53 accentue les défauts d'orientation de division et le potentiel de développement tumoral.

Les défauts de positionnement et d'orientation de l'axe de division sont également associés à d'autres défauts récurrents tels qu'une ségrégation anormale des chromosomes, la perte du contrôle de la croissance ou la modification du microenvironnement tumoral, car ils proviennent de l'activation d'oncogènes ou de l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur (APC, VHL (*Von Hippel–Lindau*)) [146], etc. [125, 143]). Il est donc difficile d'évaluer le rôle spécifique des défauts d'orientation de l'axe des divisions dans le développement tumoral. Il existe des pathologies associées à ces problèmes (telle la polycystose rénale, [147]) qui ne s'accompagnent pas de développement de tumeurs. Tous ces arguments laissent penser que la perte du contrôle de l'axe de division seule n'est pas suffisante à l'initiation tumorale,

mais qu'elle doit être combinée à d'autres facteurs pour avoir une incidence sur le développement tumoral.

- ii. Les défauts d'orientation de l'axe de division sont des facteurs pouvant contribuer au développement tumoral

Différents travaux montrent cependant qu'une mauvaise orientation de l'axe de division peut contribuer à augmenter l'agressivité et le grade de la tumeur.

Les travaux de Jaffe *et al.* [148] établissent de façon évidente le lien qui existe entre le contrôle de l'orientation de l'axe de division et l'organisation tissulaire. Ils démontrent que des cellules épithéliales intestinales cultivées dans du matrigel s'auto-organisent en acini, avec une couche cellulaire périphérique et une lumière centrale. La perte du contrôle de l'orientation de l'axe de division parallèlement à la surface de l'acinus provoque la formation d'acini avec plusieurs lumières centrales. L'organisation initiale de l'acinus est totalement perdue. Il est aisé de comprendre qu'un tel désordre, s'il intervenait dans un organe, pourrait s'amplifier et empêcherait la fonction normale du tissu. De la même façon, en intervenant au sein d'une tumeur, le défaut d'orientation de l'axe de division pourrait participer à une désorganisation encore plus importante du tissu tumoral, à son amplification, et à l'invasion totale de l'organe atteint.

Il est également proposé qu'un défaut d'orientation de l'axe de division entraîne un défaut de localisation des cellules tumorales, qui peuvent alors participer à l'invasion tumorale.

Vasiliev *et al.* [149] montrent qu'un défaut d'orientation du fuseau mitotique peut entraîner une perte des contacts cellulaires d'une des deux cellules filles, qui se détachent alors de la colonie pour flotter dans le milieu. Elle est alors capable d'adhérer à nouveau au substrat et de créer une nouvelle colonie. Cette possibilité illustrerait un phénomène de métastases. Humar et Guilford [150], quant à eux, prennent en compte l'environnement tumoral pour expliquer l'invasion des cellules tumorales dans les tissus voisins. Ils proposent que le Cancer Gastrique Diffus Héréditaire provienne de la mauvaise orientation du fuseau mitotique suite à la perte de polarité des cellules gastriques contrôlée par l'expression de la E-Cadhérine. Il en résulte un défaut de division asymétrique et les déterminants du destin des cellules filles ne sont pas correctement distribués. Cependant, ils précisent qu'une perte de l'intégrité de

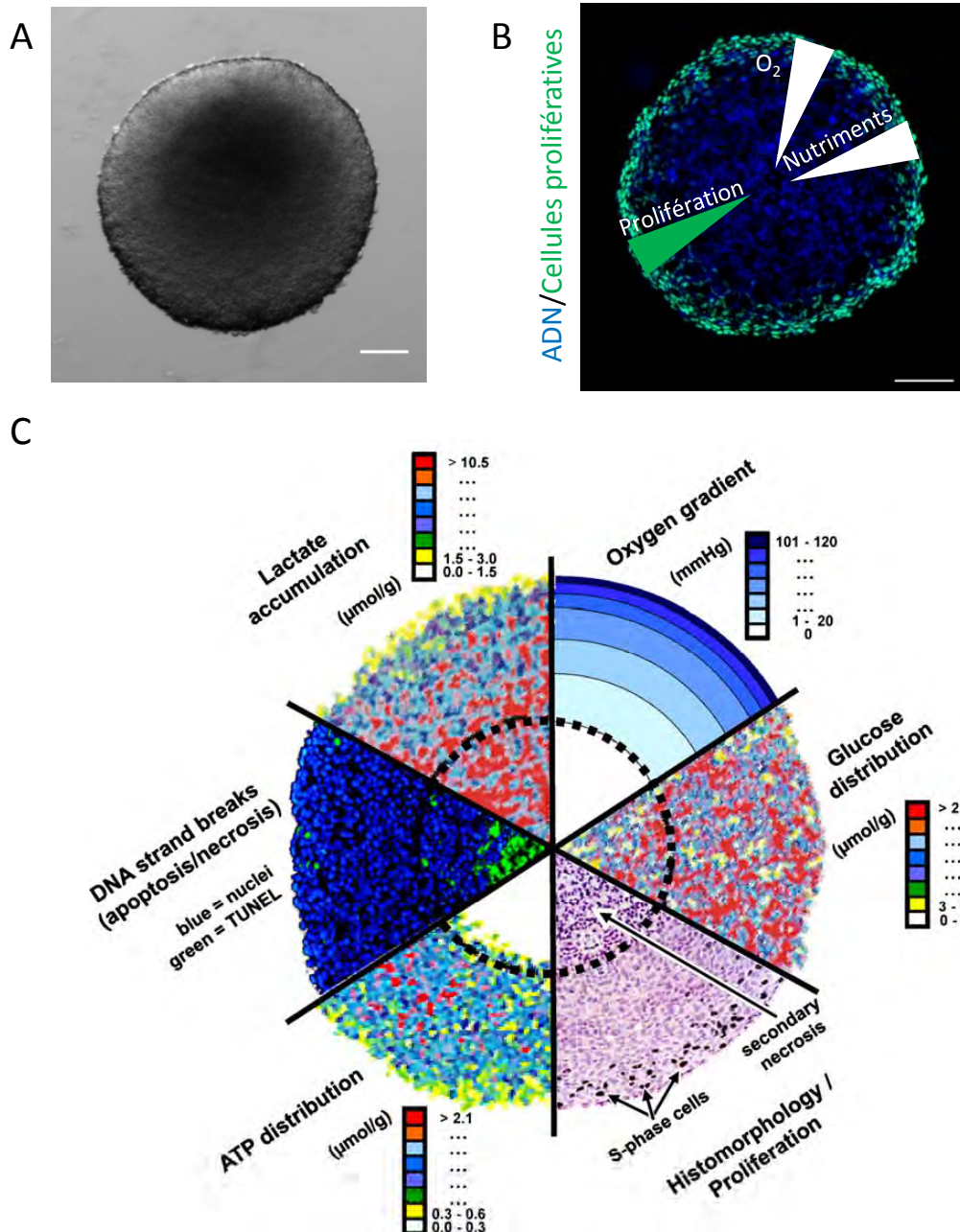


Figure 28 : Le modèle du sphéroïde

(A) Image en lumière transmise d'un sphéroïde. Barre d'échelle : 100μm.

(B) Image en fluorescence d'une coupe à congélation d'un sphéroïde dont l'ADN (bleu) et les cellules prolifératives (vert) ont été marquées. On remarque un gradient des cellules prolifératives de la périphérie vert le centre. Ce gradient, représenté par un triangle vert, résulte de la mise en place de gradients d'oxygène (O₂) et de nutriment (représentés par des triangles blancs) au fur et à mesure de la croissance du sphéroïdes. Barre d'échelle : 100μm.

(C) Combinaison d'images analytiques de sections de sphéroïdes qui reflètent les différents gradients d'oxygène, de métabolites et catabolites (Glucose et Lactate) et d'énergie produite (ATP). Ces gradients sont responsables de la mise en place de gradients de prolifération, avec les cellules en phase S concentrées en périphérie et la présence d'un cœur nécrotique au centre du sphéroïde. Ces gradients ont été déterminés selon différentes méthodes d'études.

Figure extraite de Hirschhaeuser *et al.* (2010).

la lame basale par exemple doit être associée à ces défauts de division pour que les cellules tumorales envahissent les tissus alentours. La mauvaise orientation de l'axe de division ne peut pas être seule responsable de l'invasion tumorale.

6) Intérêts du modèle du sphéroïde pour l'étude de la biologie des cellules tumorales

La culture cellulaire en deux dimensions reste largement prédominante dans les études de biologie cellulaire. Pourtant, les surfaces rigides et plates sur lesquelles adhèrent les cellules sont loin de représenter l'environnement cellulaire trouvé dans un organisme multicellulaire, et ces modèles ne permettent pas de prendre en compte l'architecture tissulaire, les régulations biochimiques et biomécaniques, et la communication cellule-cellule et cellule-matrice.

Les modèles de culture cellulaire 3D sont devenus une alternative entre la culture cellulaire 2D et l'utilisation de modèles animaux. Parmi les différents exemples de culture multicellulaire en 3D [151], le sphéroïde (**Figure 28A**) est un modèle de choix pour l'étude des comportements des cellules tumorales car il permet de reproduire *in vitro* l'organisation d'une micro-tumeur. Il est maintenant admis que ce sujet est plus prédictif de la réponse au traitement que les modèles de culture en monocouche. Il peut être utilisé pour le criblage de molécules thérapeutiques anticancéreuses.

a) Le modèle du sphéroïde mime in vitro l'organisation d'une micro-tumeur

- i. La mise en place des gradients d'oxygène, de nutriments et de prolifération au cours de la croissance des sphéroïdes

In vivo, des nodules tumoraux de moins de 1mm de diamètre, présentent des gradients d'oxygène et de nutriments. De la même façon, la croissance des sphéroïdes s'accompagne de la mise en place d'un gradient décroissant d'oxygène de la périphérie vers le centre où peut apparaître une région hypoxique [152]. Malgré l'existence de variations d'un modèle cellulaire à un autre [153], ces travaux ont démontré une diminution rapide de la pression partielle en oxygène de la périphérie vers le centre des sphéroïdes. Parallèlement au gradient d'oxygène, un gradient de glucose, de facteurs de croissance ou d'hormones se met en place, tandis qu'un gradient de catabolites s'établit de manière inverse [152, 154].

Comme dans une micro-tumeur, ces variations de l'environnement cellulaire au sein des sphéroïdes ont un impact direct sur le comportement des cellules, qui se manifeste

principalement par la mise en place progressive d'un gradient de prolifération au cours de leur croissance (**Figure 28B et C**) [152, 155]. Les cellules prolifératives se concentrent à la périphérie, où les nutriments et l'oxygène sont abondants. Des analyses sur coupes histologiques montrent la présence de cellules en prolifération jusqu'à 100 à 220µm de la périphérie en fonction du modèle étudié. Le taux de prolifération diminue en s'enfonçant dans les sphéroïdes, la proportion de cellules quiescentes augmente inversement. Lorsque les cellules ont moins d'oxygène et de nutriments, elles entrent dans un processus de mort cellulaire, conduisant à l'apparition d'un cœur nécrotique. La distance à la périphérie à partir de laquelle cette mortalité cellulaire est induite peut varier entre 50 à 300µm en fonction du modèle cellulaire utilisé, de la concentration et du taux de consommation de substrats cellulaires comme l'oxygène ou le glucose, du degré de compaction cellulaire, de l'accumulation de catabolites ou d'une augmentation de l'acidité cellulaire.

L'ensemble de ces données montre que le modèle de sphéroïde permet de reproduire *in vitro* les différents gradients et l'hétérogénéité cellulaire qui existe au sein d'une microrégion tumorale ou de micro-métastases.

ii. Le modèle sphéroïde reproduit les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire

La culture cellulaire sous forme de sphéroïde permet de reproduire les interactions cellulaires dans leurs trois dimensions, telles qu'elles existent *in vivo*. Même si la matrice extracellulaire participe à la cohésion des sphéroïdes, les interactions cellule-cellule sont quasiment indispensables à leur formation et à leur maintenance [156, 157]. Konze *et al.* (2014) [158] démontrent que les jonctions adhérentes formées à partir des E-Cadhérines ne sont pas régulées de la même façon dans des cellules en monocouche et dans des sphéroïdes. En 3D, la E-Cadhérine est clivée par la calpaïne pour se dissocier des jonctions adhérentes, être redistribuée sur toute la surface des cellules et établir des jonctions intercellulaires homophiliques. L'inhibition de la calpaïne suffit à empêcher la formation et la maintenance des sphéroïdes.

Les jonctions cellulaires, en tant qu'acteurs de la mécanotransduction, participent certainement à la régulation des comportements cellulaires au sein des sphéroïdes [157]. Au-delà du rétablissement des jonctions cellulaires, le modèle du sphéroïde est capable

d'induire la sécrétion de molécules de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et la laminine, dont la composition et l'organisation se rapprochent de celle des tumeurs correspondantes [159, 160]. Des profils d'expression différents des protéines des jonctions cellules-matrice, pas seulement entre des cellules en monocouche ou sous forme de sphéroïdes, mais également au sein même des sphéroïdes selon la distance à la surface, ont été mis en évidence [161].

L'architecture multicellulaire dans son ensemble, c'est-à-dire en intégrant les interactions cellules-cellules et cellules-matrice, joue un rôle important dans la révélation du phénotype des cellules [162, 163]. La culture de cellules mammaires dans du Matrigel, qui mime la membrane basale, permet de révéler des distinctions d'organisation multicellulaire et de comportement entre les cellules normales et les cellules malignes (**Figure 29**). En effet, les cellules malignes forment des colonies désorganisées et invasives, alors que les cellules normales forment des acini qui se rapprochent de l'organisation originale du tissu mammaire. L'inhibition de l'activation aberrante de voies de signalisation dans les cellules tumorales suffit à éteindre le phénotype tumoral et à retrouver une organisation multicellulaire en acini. Effectivement, la culture en 3D modifie l'expression génique [164] et le contenu protéique des cellules [165]. Les profils génomique et protéomiques correspondent davantage à ceux des cellules tumorales *in vivo* [166].

iii. Le modèle du sphéroïde est un modèle de choix pour les études pharmacologiques

Différentes données montrent que le modèle sphéroïde est plus prédictif de la réponse observée *in vivo* comparativement aux modèles de culture en monocouche [167]. Les cellules cultivées en 3D présentent une sensibilité plus faible vis-à-vis d'agents chimiothérapeutiques que les mêmes cellules cultivées en monocouche, et surtout similaire à celles observées pour des modèles de xénogreffes [168]. En fait, la prédictivité du modèle sphéroïde est en partie liée au fait que ce modèle permet de reproduire la résistance multicellulaire [169]. Effectivement, sa structure limite la pénétration de certaines molécules, mais c'est également la présence de zones hypoxiques, l'hétérogénéité cellulaires, et l'organisation tridimensionnelle qui participent à la résistance multicellulaire.

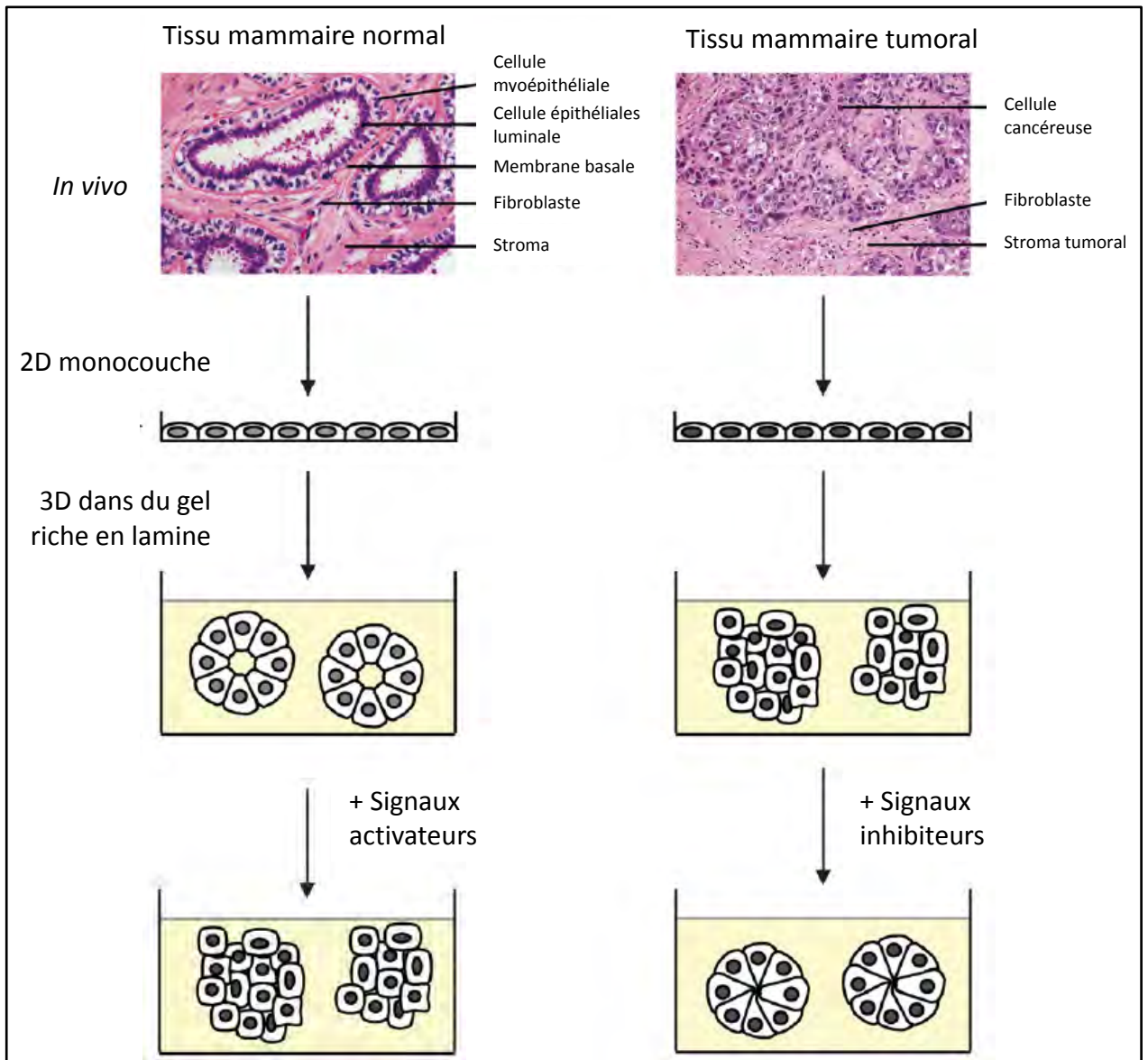


Figure 29 : L'architecture tissulaire participe à la révélation des phénotypes cellulaires

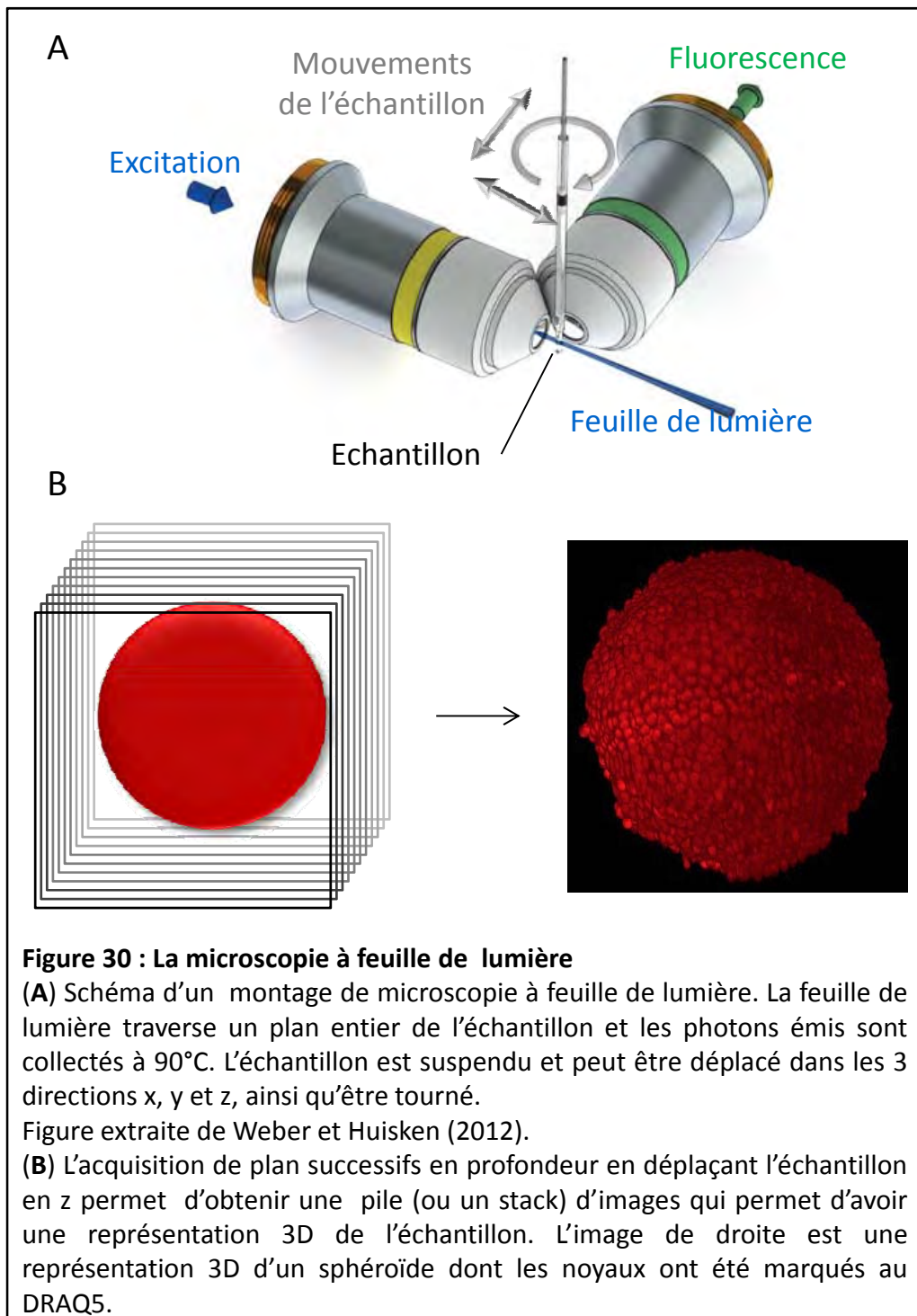
En haut : sections tissulaires de tissus mammaire normal et tumoral. Le tissu mammaire normal est hautement organisé, et cette organisation est perdue dans le tissu tumoral. Au milieu : la culture de cellules provenant d'un tissu mammaire normal ou tumoral forme des monocouches indistinctes l'une de l'autre en 2D. Dans un gel riche en lamine mimant la membrane basale, les cellules épithéliales provenant d'un tissu mammaire normal ou tumoral forment des structures différentes. Les cellules normales forment des acini avec une lumière centrale, alors que les cellules tumorales forment des agrégats désorganisés. En bas : l'activation de voies de signalisation aberrantes dans les cellules normales induit leur désorganisation, et inversement leur inhibition dans les cellules malignes permet de renverser leur organisation vers une architecture normale.

Figure extraite de Weigelt *et al.* (2008).

Le sphéroïde est donc un modèle pertinent pour l'étude des réponses aux traitements anticancéreux, car il permet de reproduire cette résistance multicellulaire telle qu'elle existe *in vivo*.

L'utilisation du sphéroïde comme modèle de complexité intermédiaire entre les cultures 2D et les modèles animaux paraît judicieux pour mieux estimer l'efficacité *in vivo* antitumorale des drogues et optimiser le développement d'un traitement [170]. Il met en évidence l'inactivité en 3D de composés actifs sur cellules cultivées en 2D et réduit les tests effectués sur les animaux. Inversement, ce modèle pourrait révéler l'activité et l'intérêt de certaines drogues ou de certaines combinaisons qui n'auraient aucun effet sur des cultures cellulaires en 2D.

Ce modèle possède un intérêt majeur à être utilisé dans l'évaluation de la réponse aux traitements [155]. Pour que les sphéroïdes soient utilisés en routine dans les cribles pharmacologiques, leur formation doit être aisée, reproductible et parfaitement maîtrisée. L'analyse de la réponse aux drogues doit être la plus facile et la plus directe possible. Différentes techniques permettant l'obtention de sphéroïdes de taille homogène existent, dont la plus efficace est la culture de cellules dans des plaques de puits à fond rond recouverts d'un polymère antiadhésif, le PolyHEMA [171, 172]. Les études fonctionnelles et les études sur sphéroïdes entiers restent encore trop souvent limitées par l'épaisseur et l'organisation des échantillons qui représentent une véritable barrière pour les techniques classiques de transfection et d'immunomarquage. Des méthodes alternatives qui reposent sur l'analyse de paramètres globaux comme l'augmentation du volume ou l'analyse par immunodétection sur coupes, ou sur l'analyse des cellules composant les sphéroïdes après dissociation se développent [173]. Dernièrement, Reid *et al.* [174] ont mis au point un algorithme qui permet l'analyse automatique et en temps réel de rapporteurs phénotypiques fluorescents à partir de l'imagerie de plans de sphéroïdes entiers et vivants. Cette méthode peut s'appliquer à de nombreux modèles de sphéroïdes pour déterminer la réponse multicellulaire à des traitements. De plus, elle permet d'identifier le mode d'action de la molécule sur le sphéroïde, par exemple en différenciant des effets localisés à la périphérie ou sur l'ensemble du sphéroïde. Des progrès restent à faire, mais en raison du potentiel important que présente le modèle du sphéroïde, des méthodes d'analyses vont



rapidement se développer pour faciliter et préciser l'étude des comportements des cellules tumorales et leur réponse aux traitements anticancéreux [172, 175].

b) Imagerie du sphéroïde par Microscopie à feuille de lumière

Malgré les progrès réalisés sur l'analyse de ce modèle 3D, ces caractéristiques rendent difficiles l'analyse à l'échelle cellulaire ou unicellulaire. Le modèle du sphéroïde est un modèle dense, inhomogène et épais, et même si l'imagerie biphotonique permet une meilleure pénétration que l'imagerie confocale, elle nécessite des temps d'exposition très longs qui induisent de la phototoxicité, sa résolution 3D restant assez mauvaise. Des techniques d'imageries innovantes ont été nécessaires pour exploiter les bénéfices de la 3^{ème} dimension [176, 177]. L'imagerie à feuille de lumière [178], dont le principe existe depuis des dizaines d'années, a connu un fort développement ces dernières années, qui l'ont conduit à devenir l'outil de choix pour l'imagerie des sphéroïdes [179, 180]. Notre équipe a développé un de ces microscopes, le SPIM (Single Plane Illumination Microscopy), et l'a adapté spécifiquement à l'imagerie en temps réel, en 3 dimensions et en profondeur, de phénomènes cellulaires dans les sphéroïdes.

Dans ce microscope, une feuille de lumière illumine un plan entier de l'échantillon par le côté. Les photons émis sont collectés par un objectif de détection positionné perpendiculairement (**Figure 30A**). L'échantillon est suspendu au milieu de la feuille de lumière, et peut être déplacé dans les 3 directions, mais également être tourné pour acquérir plusieurs angles de vue. Une pile (ou un stack) d'images acquises à différents plans en profondeur dans l'échantillon, peut être imagée en déplaçant successivement l'échantillon en z à travers la feuille de lumière (**Figure 30B**). Cette disposition permet un sectionnement optique rapide, en 3D et en profondeur, ce qui réduit la phototoxicité et le photoblanchiment. La résolution en z est donnée par l'épaisseur de la feuille de lumière, c'est-à-dire environ 3µm dans la configuration du microscope utilisé. Elle est donc adaptée à l'acquisition de phénomènes cellulaires. Pour imager les sphéroïdes, ceux-ci sont placés individuellement dans des cuves en phytigel qui sont maintenus dans une petite cage de résine elle-même suspendue par une tige qui relie le porte-objet motorisé [181]. La cuve baigne dans du milieu physiologique contenu dans une chambre en résine.

L'imagerie des sphéroïdes avec le SPIM nécessite d'utiliser des échantillons marqués, ou qui

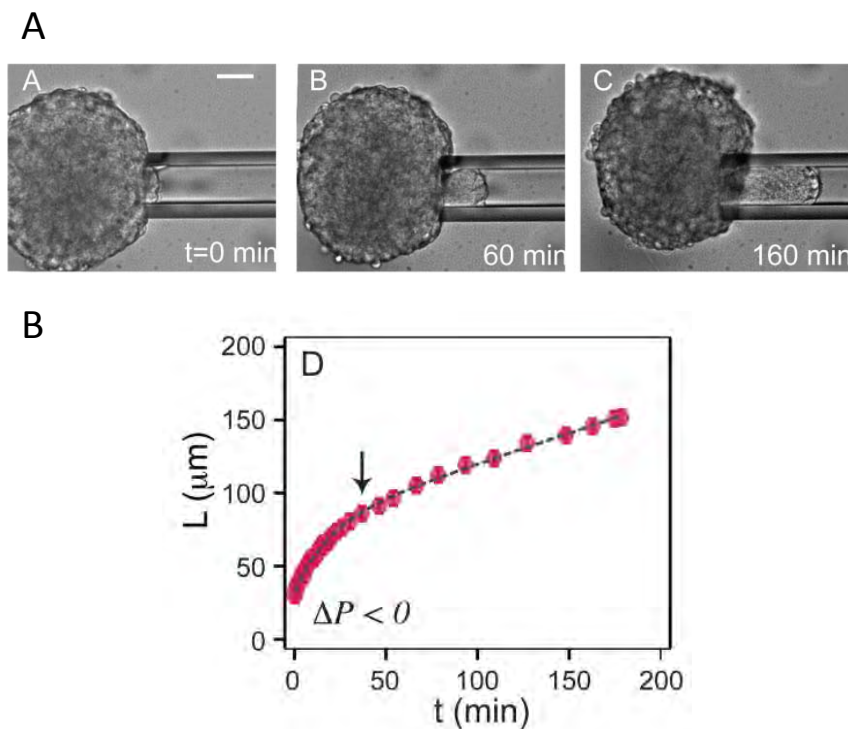


Figure 31 : Méthode de mesure des propriétés mécaniques des cellules par aspiration avec micropipette

(A) Photos en lumière transmise de l'aspiration d'un sphéroïde avec une micropipette. La zone aspirée est visible dans la pipette et augmente entre 60 et 160 minutes. Barre d'échelle : 50μm.

(B) Déformation (L) en μm sous l'effet de l'aspiration sous une pression de 1180Pa. La flèche indique la transition entre la réponse élastique et la réponse cellulaire.

Figures extraites de Guevorkian *et al.* (2010)

expriment des protéines d'intérêt fluorescentes. L'établissement de lignées exprimant de façon stable les transgènes d'intérêt permet le suivi des phénomènes cellulaires sur de longues durées de culture.

c) Le modèle du sphéroïde est adapté à l'étude de l'impact des propriétés mécaniques sur le comportement des cellules tumorales

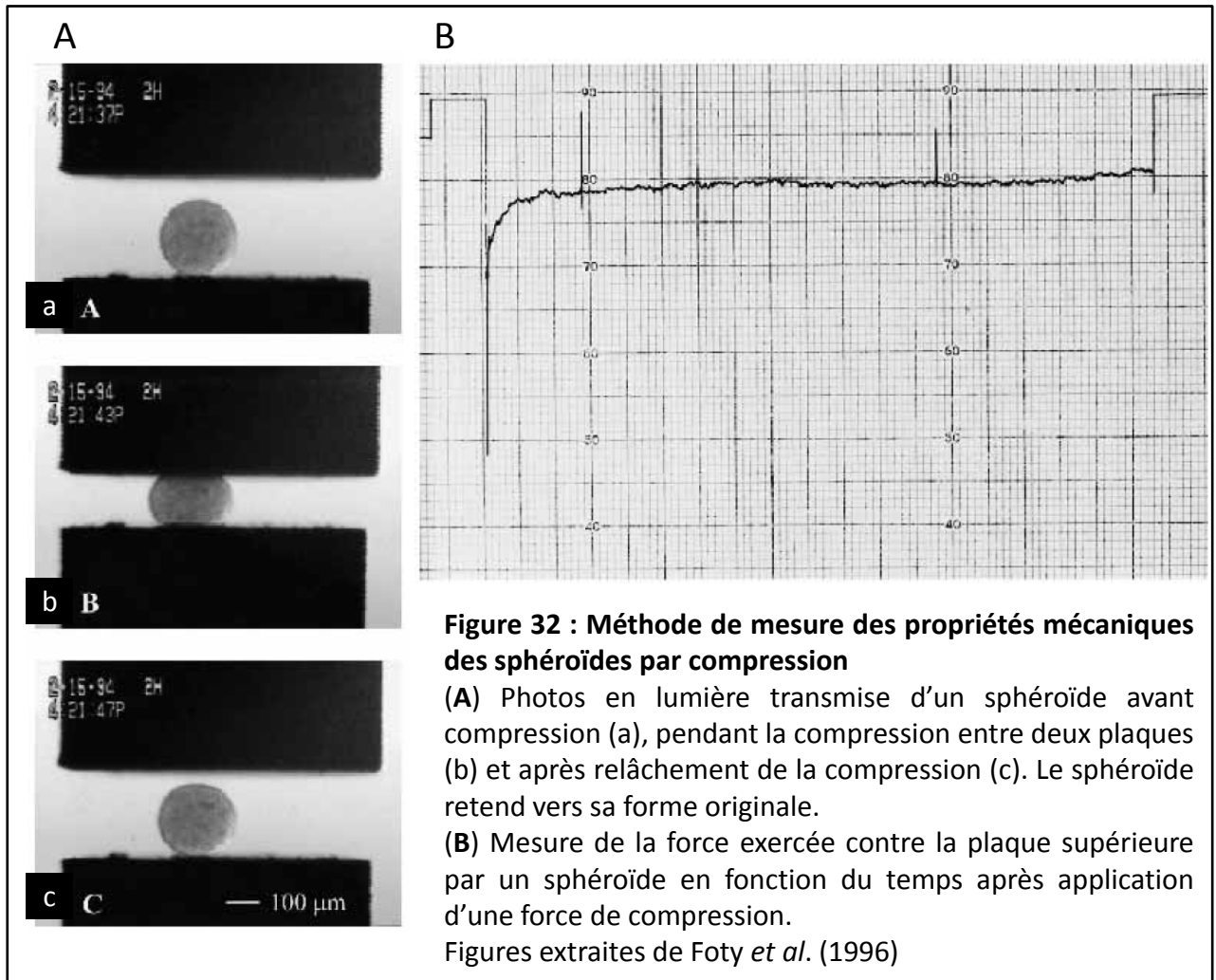
Le modèle du sphéroïde est adapté à l'étude des propriétés mécaniques des tumeurs, et à celle de l'impact des contraintes mécaniques sur les comportements des cellules tumorales.

i. Techniques de mesure des propriétés mécaniques et des forces existantes au sein des sphéroïdes

La découverte de l'importance des propriétés physiques du microenvironnement a conduit au développement de nombreuses stratégies de biomécanique cellulaire et de techniques d'analyse des forces et des propriétés mécaniques des tissus et des cellules. Certaines sont applicables au sphéroïde.

Historiquement, la technique prévalente a été celle de la micropipette d'aspiration [182]. Initialement utilisée pour mesurer les propriétés viscoélastiques des cellules [183], elle est également utilisable pour mesurer la viscosité et la rigidité d'un tissu. L'aspiration d'une surface de sphéroïde correspondant à 20% du diamètre du sphéroïde (ou au diamètre de 4 à 10 cellules) induit une déformation rapide et élastique, puis induit un flux cellulaire constant (**Figure 31**). La mesure de la première déformation a permis au groupe de F. Brochard-Wyart [184, 185] de déterminer que la rigidité de sphéroïdes de cellules murines de sarcome de 150-300µm est d'environ 700Pa.

D'autres types de micromanipulations permettent de mesurer des propriétés mécaniques de cellules ou de tissus. A titre d'exemple, celle réalisée par l'équipe de R.K. Assoian et P.A. Janmey [186] avec simplement une sonde tensiométrique et un micromanipulateur hydraulique, a permis de mesurer les propriétés mécaniques globales de petits échantillons biologiques. La compression des sphéroïdes entre deux plaques parallèles est utilisée pour mesurer leur tension de surface (**Figure 32**). La compression impose une déformation au sphéroïde. La mesure du rayon principal de l'agrégat comprimé et de l'angle de contact



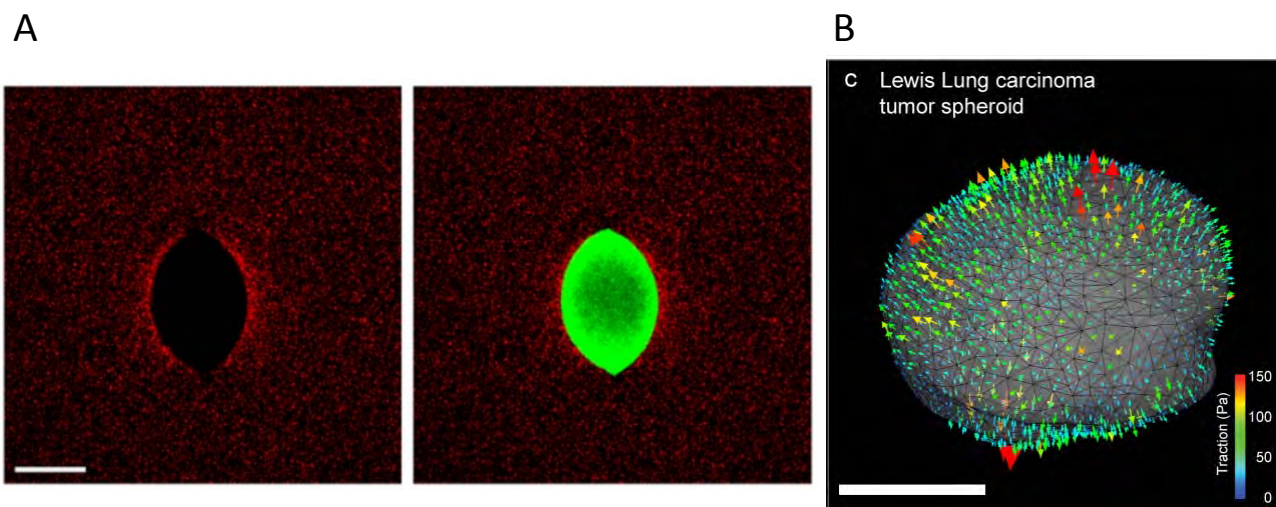


Figure 33 : Méthode de mesure des forces exercées par les sphéroïdes sur le gel par pistage de billes fluorescentes

(A) Image des billes fluorescentes (rouges) détectées dans le gel environnant un sphéroïde (vert). L'accumulation de billes a été induite par la croissance du sphéroïde et indique une zone riche en tensions. Barre d'échelle 150μm.

Figure extraite de Cheng *et al.* (2009)

(B) Des cellules de carcinome pulmonaire enrobées dans de l'hydrogel forme des sphéroïdes après 72h de culture. L'expansion du sphéroïde déforme l'hydrogel environnant et exerce des forces de tractions dirigées perpendiculairement à la surface vers l'extérieur du sphéroïde, sur toute la surface du sphéroïde. Ces forces ont été mesurées par la méthode du pistage des billes fluorescentes contenues dans l'hydrogel. La barre d'échelle colorée présente l'amplitude des forces de traction exprimées par le sphéroïde sur le gel. Barre d'échelle métrique : 20μm.

Figure extraite de Legant *et al.* (2010)

A

Concentration du gel	Taille initiale des sphéroïdes (μm)	Taille finale des sphéroïdes (μm)	Stress accumulé à terme autour des sphéroïdes (mmHg)
0,5%	20	414	45
0,8%	24	360	100
0,9%	24	200	120
1%	24	85	50

B

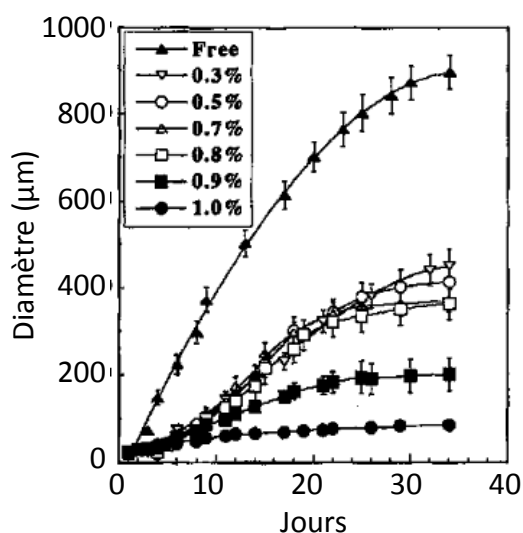


Figure 34 : Sphéroïdes mécaniquement contraints dans de l'agarose

(A) Tableau regroupant les variations de taille et l'accumulation de stress autour des sphéroïdes en fonction de la densité du gel d'agarose dans lequel ils sont enrobés. Les valeurs représentent des moyennes pour une population de sphéroïdes. L'augmentation de la concentration en agarose induit une accumulation de stress et une diminution de la croissance des sphéroïdes. Cependant, à 1% d'agarose, les sphéroïdes ne répondent plus à leur microenvironnement et ne grossissent plus.

(B) Graphe représentant la croissance des sphéroïdes LS174S libre en suspension (Free), ou dans des gels de concentrations croissantes d'agarose (0,3 à 1%).

Figure extraite de Helmlinger *et al.* (1997)

entre l'agrégat et la plaque de compression permettent de déduire la tension de surface des sphéroïdes [187]. Le retour de l'agrégat à sa forme initiale immédiatement après une compression de courte durée dépend des propriétés élastiques de l'agrégat. Le groupe de G. Forgacs et M.S. Steinberg [188] note que le relâchement du sphéroïde à plus long terme reflète les réarrangements cellulaires qui s'opèrent jusqu'à ce qu'un état d'équilibre de force soit atteint.

Parmi les méthodes de mesures des forces existantes au sein des tissus, le pistage « *tracking* » de billes fluorescentes permet de mesurer les tractions exercées par des sphéroïdes enrobées dans du gel. Le déplacement des billes peut être acquis par microscopie à haute résolution puis mesuré (**Figure 33A**). Des outils mathématiques permettent de déduire de ces déplacements les forces de tractions exercées localement par les cellules sur le gel [189] (**Figure 33B**). Gordon *et al.* [40] ont mesuré que de petits sphéroïdes de cellules de glioblastome (moins de 200µm de diamètre) exercent, dès 6h d'enrobage, des forces de traction sur le gel, dirigées vers l'extérieur des sphéroïdes, corrélé à la croissance des sphéroïdes. En même temps, les cellules qui commencent à envahir le gel exercent des forces de tractions dirigées vers le sphéroïde. Les sphéroïdes, selon le comportement des cellules les composant, sont capables d'exprimer à la fois des forces de traction et de pression sur son environnement.

ii. Etudes de l'impact des contraintes mécanique sur la croissance des sphéroïdes

Le modèle du sphéroïde est également adapté à l'étude de la réponse tumorale multicellulaire aux contraintes mécaniques. Comme présenté en amont, des études ont déjà été menées pour éclaircir le comportement tumoral induit par les contraintes mécaniques. Parmi les travaux pionniers dans ce domaine, ceux de Helmlinger *et al.* du groupe de R.K. Jain [59], montrent que la croissance de sphéroïdes dans des gels d'agarose induit l'accumulation de stress solide au sein des sphéroïdes. Le stress solide accumulé (de 45 à 120mmHg, **Figure 34A**) serait suffisant pour induire la destruction des vaisseaux au sein du tissu tumoral. Une contrainte mécanique trop grande inhibe l'interaction mécanique des cellules avec le gel, et la taille des sphéroïdes n'évolue plus. Une contrainte mécanique plus modérée induit une inhibition de la croissance des sphéroïdes (**Figure 34B**), qui se manifeste

par une diminution du taux de prolifération. Cette croissance dans un environnement confiné s'accompagne également d'une inhibition de la mort cellulaire par apoptose, qui pourrait être dû à un avantage de survie induit par la compaction cellulaire. En 2009, la même équipe [60] a repris ce modèle de sphéroïdes contraints dans des gels d'agarose. Ils ont confirmé l'accumulation de stress solide dans le voisinage immédiat des sphéroïdes contraints. Lorsque le stress appliqué sur les sphéroïdes est inégal, l'apoptose est induite dans les zones fortement compressives, et la prolifération dans les zones faiblement compressibles. Loessner *et al.* [190] montrent cependant que la croissance de sphéroïdes s'accompagne, à long terme (28 jours), d'une augmentation de l'apoptose. Le groupe de J-F. Joanny [191] a utilisé une autre méthode de compression des sphéroïdes par l'augmentation de la pression osmotique par ajout de dextran dans le milieu de culture. Cette pression osmotique induit une force de pression qui s'applique sur les sphéroïdes. De la même façon que précédemment, la contrainte mécanique réduit la prolifération.

Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de données concernant les mécanismes impliqués dans le contrôle de la prolifération par la contrainte mécanique au sein des microtumeurs. Les études de la régulation de la prolifération par l'environnement mécanique portent généralement sur la division et sont généralement réalisées sur des cellules cultivées en deux dimensions, qui ne reproduisent donc pas l'environnement tumoral. **Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était de caractériser l'impact de la contrainte mécanique sur la division cellulaire, dans le modèle multicellulaire tumoral qu'est le sphéroïde.**

RESULTATS

PARTIE 1 :

ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR LA PROGRESSION EN MITOSE DANS LE MODELE DU SPHEROÏDE

Comme présenté en Introduction, au cours du développement tumoral, les populations de cellules tumorales sont exposées à différents stress mécaniques et en particulier à un stress mécanique résultant de la résistance des tissus environnants. Afin d'étudier l'impact de ce stress mécanique sur la prolifération cellulaire, nous avons développé une stratégie expérimentale permettant d'induire un stress mécanique au cours de la croissance des sphéroïdes. Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence les effets de la contrainte sur la division cellulaire au sein des sphéroïdes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue Plos One.

1) Résultats

La stratégie expérimentale utilisée consiste à faire croître des sphéroïdes dans des gouttières en PDMS (*Polydiméthylsiloxane*) de 300µm de large. La croissance de sphéroïdes confinés entre ces murs de PDMS distants de 300µm mime la croissance de microtumeurs dans un environnement confiné. Ce modèle induit une accumulation de stress solide qui se révèle par un relâchement du sphéroïde lorsque celui-ci est retiré du microdispositif en PDMS, ainsi que par une augmentation de la densité cellulaire. Ainsi, après 6 jours de croissance entre les murs de PDMS, les sphéroïdes sont mécaniquement contraints.

Comme précisé en Introduction Générale, la croissance de sphéroïdes s'accompagne de la mise en place de gradients de nutriments et d'oxygène qui induisent la mise en place de gradient de prolifération. L'analyse de la distribution des cellules prolifératives et des cellules apoptotiques a permis d'analyser l'impact de la contrainte mécanique sur l'établissement du gradient de prolifération. Contrairement aux sphéroïdes contrôles, les sphéroïdes contraints présentent des cellules prolifératives sur l'ensemble du volume du sphéroïde. Parallèlement, la contrainte mécanique n'induit ni mort cellulaire, ni zone hypoxique. La contrainte mécanique modifie ainsi l'établissement des gradients de prolifération, probablement à cause d'une modification des gradients d'oxygène et de nutriments.

En accord avec ces observations, l'analyse de la répartition des cellules mitotiques dans les sphéroïdes après 6 jours de croissance sous contrainte révèle la présence de cellules en mitose dans tout le volume des sphéroïdes contraints. Toutefois, la codétection de l'incorporation continue pendant 24h d'un analogue de la thymidine, l'EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*), permettant de visualiser les cellules ayant répliqué leur ADN, et de l'histone H3 phosphorylée (H3P), marquant les cellules en mitose, a révélé la présence de deux sous-populations de cellules mitotiques dans les sphéroïdes contraints. La majorité des cellules mitotiques ont intégré de l'EdU dans les dernières 24h, soulignant un état prolifératif actif. Cependant, nous avons également mis en évidence l'existence d'une sous-population de cellules mitotiques n'ayant pas intégré d'EdU dans les dernières 24h, suggérant que les cellules ont passé la phase S depuis plus de 24h. L'analyse du pourcentage de cellules en mitoses EdU-négatives montre que ce pourcentage est multiplié par 6 dans les sphéroïdes contraints comparativement aux sphéroïdes contrôles. Ces résultats suggèrent que la contrainte mécanique perturbe la progression en mitose des cellules au sein des sphéroïdes.

L'augmentation de cette sous-population de cellules mitotiques entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour de croissance entre les murs de PDMS, laisse penser que ces cellules mitotiques n'ayant pas intégré d'EdU s'accumulent sous l'effet de la contrainte mécanique. Le marquage des pôles du fuseau a révélé une augmentation de la proportion de cellules mitotiques monopolaires et tripolaires dans les sphéroïdes contraints, par rapport aux sphéroïdes contrôles. Ce résultat suggère que la contrainte mécanique induit un défaut de mise en place du fuseau bipolaire au sein des sphéroïdes. De plus, nous avons montré que ce défaut n'est pas dû à un défaut d'arrondissement des cellules mitotiques au sein des sphéroïdes.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence que :

- **La croissance de sphéroïde entre deux murs de PDMS induit une accumulation de stress solide ;**
- **La contrainte mécanique induit une réorganisation des gradients de prolifération au sein des sphéroïdes ;**
- **La contrainte mécanique empêche la progression en mitose d'une population de cellules**

- La contrainte mécanique induit un défaut de mise en place du fuseau mitotique bipolaire dans des cellules mitotiques qui sont pourtant parvenues à s'arrondir.

2) Article

Mechanical stress impairs mitosis progression in Multicellular Tumor Spheroids

Desmaison Annaïck, Frongia Céline, Grenier Katia, Ducommun Bernard, Lobjois Valérie
PLoS ONE 8(12): e80447.

Mechanical Stress Impairs Mitosis Progression in Multi-Cellular Tumor Spheroids

Annaïck Desmaison^{1,2}, Céline Frongia^{1,2}, Katia Grenier³, Bernard Ducommun^{1,2,4*}, Valérie Lobjois^{1,2*}

1 Université de Toulouse, ITAV-USR3505, Toulouse, France, **2** CNRS, ITAV-USR3505, Toulouse, France, **3** CNRS, LAAS-UPR81001, Toulouse, France, **4** CHU de Toulouse, Toulouse, France

Abstract

Growing solid tumors are subjected to mechanical stress that influences their growth rate and development. However, little is known about its effects on tumor cell biology. To explore this issue, we investigated the impact of mechanical confinement on cell proliferation in MultiCellular Tumor Spheroids (MCTS), a 3D culture model that recapitulates the microenvironment, proliferative gradient, and cell-cell interactions of a tumor. Dedicated polydimethylsiloxane (PDMS) microdevices were designed to spatially restrict MCTS growth. In this confined environment, spheroids are likely to experience mechanical stress as indicated by their modified cell morphology and density and by their relaxation upon removal from the microdevice. We show that the proliferation gradient within mechanically confined spheroids is different in comparison to MCTS grown in suspension. Furthermore, we demonstrate that a population of cells within the body of mechanically confined MCTS is arrested at mitosis. Cell morphology analysis reveals that this mitotic arrest is not caused by impaired cell rounding, but rather that confinement negatively affects bipolar spindle assembly. All together these results suggest that mechanical stress induced by progressive confinement of growing spheroids could impair mitotic progression. This study paves the way to future research to better understand the tumor cell response to mechanical cues similar to those encountered during in vivo tumor development.

Citation: Desmaison A, Frongia C, Grenier K, Ducommun B, Lobjois V (2013) Mechanical Stress Impairs Mitosis Progression in Multi-Cellular Tumor Spheroids. PLoS ONE 8(12): e80447. doi:10.1371/journal.pone.0080447

Editor: Adam J. Engler, University of California San Diego, United States of America

Received: June 20, 2013; **Accepted:** October 2, 2013; **Published:** December 3, 2013

Copyright: © 2013 Desmaison et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: AD is a recipient of a doctoral fellowship by the Association pour la Recherche contre le Cancer and is a fellow of the Ecole de l'Inserm Liliane Bettencourt. This work was supported by the CNRS, Université Paul Sabatier, Région Midi-Pyrénées, Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe labellisée) and ANR (12-BSV5-0008-01). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bernard.ducommun@itav-recherche.fr (BD); valerie.lobjois@itav-recherche.fr (VL)

Introduction

A tumor micro-region consists of a heterogeneous cancer cell population organized in a 3D structure in which cell growth is influenced by interactions with the microenvironment. The crosstalk between tumor cells and microenvironmental components, including the extracellular matrix (ECM), fibroblasts, endothelial and immune cells, is essential for tumor progression and drug resistance [1,2]. In such complex environment, tumor growth and progression is influenced not only by biochemical parameters such as growth factors, cytokines, hormones or hypoxia, but also by mechanical cues [3,4]. Indeed, sensing compression and tension forces (i.e., mechano-sensing) is an important component of cell physiology and changes in the mechanical homeostasis within tissues are observed during tumor growth [3,5]. Cells sense forces through mechanoreceptors that are located at the plasma membrane and that transduce the information to the intracellular machinery to elicit a specific response to external mechanical cues [6]. Modification of the mechanical environment can modulate tumor cell growth [7], migration and invasion [7–10] as well as proliferation and apoptosis [11,12].

One of the hallmarks of cancer cells is their ability to sustain uncontrolled proliferation through deregulation of cell cycle control mechanisms [2]. Many studies have contributed to deciphering the complex regulatory networks of proteins and

biochemical signals that govern the progression of a cell through mitosis. Moreover, it has been demonstrated that mitosis progression is also mechanically regulated. Indeed, cell division is directed by the environment geometry and ECM organization [13,14], requires cell rounding and depends on the interaction of the mitotic spindle with actin cytoskeleton components. However, the impact of mechanical cues on mitotic progression has been documented essentially using 2D monolayer-based models and very little is known about the consequence of mechanical stress on cell division within tumors.

Multicellular tumor spheroids (MCTS), in which cancer cells are cultured as 3D organized aggregates, are attractive models to investigate this issue. These complex multicellular systems reproduce the cell-cell and cell-matrix interactions found in solid tumors [15]. Moreover, MCTS can grow up to several hundred micrometers in diameter and progressively display a gradient of proliferating cells similar to what found in tumor micro-regions. Specifically, in large spheroids, dividing cells are in the outmost layers and quiescent cells are located more centrally in hypoxic and nutrient-poor regions [16,17].

In this study, we used MCTS as experimental model to explore how a confined mechanical environment can affect tumor cell division within an organized tumor cell population. To this aim, we designed and produced dedicated polydimethylsiloxane (PDMS) microdevices that alter the microenvironment geometry and in which MCTS growth was mechanically confined. We show

that such conditions do not impair cell rounding, but negatively affect mitotic progression by altering spindle polarity.

Results

MCTS growth in conditions of mechanical confinement

To evaluate the impact of mechanical confinement on MCTS growth, HCT116 colorectal cancer cell spheroids of 300 μm in diameter were transferred in especially designed channel-shaped PDMS microdevices (see Fig. 1 for a description of the experimental system). In these confined culture conditions, MCTS progressively elongated as they grew within the channel of the PDMS device and acquired a rod-shaped morphology (Fig. 1B). Cell density (number of cells/ μm^2) was higher in the body (peripheral and central areas), but not in the tips, of confined spheroids compared to control MCTS (Fig. 2A and Fig. 1D for a schematic description of the spheroid areas). As increased cell density has been reported in multicellular spheroids subjected to solid stress [12], we asked whether MCTS grown in confined conditions were mechanically stressed. Thus, MCTS were removed from the PDMS microdevice and their shape analyzed by time-lapse microscopy over time. Following removal from the PDMS microdevice, rod-shaped MCTS immediately relaxed and very rapidly acquired the round shape of control spheroids (Fig. 2B, C and Movie S1). This result and the increased cell density in the body region of confined spheroids strongly suggest that MCTS within the microdevice walls experience growth-associated mechanical stress.

We then analyzed the impact of growth-induced mechanical confinement on cell proliferation by immunodetection of the proliferative marker Ki67 (Fig. 3B and S1B) in MCTS cryosections that were parallel to the bottom of the channel (as depicted in Fig. 1C). In confined MCTS, Ki67-positive cells were present in the whole spheroid, but for a small area in the center. Conversely, in control MCTS grown in suspension, Ki67 staining was restricted to the outmost cell layers, as expected. Fluorescence intensity profiles (Figure S1F) confirmed these observations. Similar results were also obtained for Cyclin A, a marker of cells progressing to the S- and G2-phase of the cell cycle (Fig. 3C and S1C & F). This finding indicates that, in mechanically confined growth conditions, proliferative cells are found even in the most inner cell layers of rod-shaped MCTS. This was confirmed also by the absence of hypoxia (detected by pimonidazole staining) and of apoptotic cells (detected by cleaved PARP staining) in mechanically confined MCTS in comparison to control MCTS (Fig. 3D, E and S1D & E).

In mechanically confined MCTS, mitotic cells are evenly distributed in the entire spheroid structure

To characterize the effect of growth-induced mechanical stress on cell division within MCTS, the expression of phosphorylated Histone H3 (pH3; a marker of mitotic cells) was investigated after 6 days of growth in control or confined conditions (Fig. 4A). In control MCTS, pH3-positive mitotic cells were restricted to the outer cell layers (within the external 70 μm) (Fig. 4B), in accordance with the existence of a proliferative gradient [18] (Fig. 3B,C). Conversely, in mechanically confined MCTS (cryosections parallel to the bottom of the microdevice), pH3-positive mitotic cells were homogeneously distributed in the entire body of the spheroid structure (i.e., up to 150 μm away from the microdevice walls and in the spheroid body) (Fig. 4B). Similar results were obtained also using sections that were cut perpendicularly to the bottom of the PDMS microdevice through the center of the MCTS (Fig 1C and 4B). This observation was confirmed by

quantifying the percentage of mitotic cells (Fig. 4C) in the peripheral (P) and central (C) areas of control and confined spheroids (see Fig. 1D for a schematic representation of these areas). These data indicate that spheroid growth in confined conditions is associated with loss of mitotic cell regionalization.

Mechanical stress induces mitotic arrest in MCTS

Accumulation of mitotic cells in mechanically confined MCTS could result from enhanced cell proliferation or from mitotic arrest. To explore these hypotheses, control and mechanically confined MCTS were incubated with EdU for 24 hours prior to fixation (total culture time = 6 days). Preliminary experiments determined that this incubation time was required to ensure that EdU was incorporated by the majority of proliferating cells during DNA replication (data not shown). Analysis of EdU incorporation in cryosections parallel to the bottom of the microdevice and passing through the center of mechanically confined MCTS (Fig. 5A) indicated that EdU-positive cell distribution is comparable to that of Ki67-positive cells (see high-contrast image in the bottom panel of Fig. 5A), showing that EdU was well incorporated and confirming that proliferating cells are present everywhere in mechanically stressed MCTS.

In these experimental conditions, mitotic cells (as indicated by pH3 staining) that underwent S-phase during the last 24 hours should have incorporated EdU. However, while in the tips of mechanically confined MCTS most pH3-positive cells were also EdU-positive, in the body of confined MCTS a number of pH3-positive cells were EdU-negative (Fig. 5A, B). This was not due to incomplete EdU penetration in the MCTS body, because EdU/pH3 double positive cells were detected in proximity of pH3-positive cells that did not incorporate EdU (Fig. 5B, arrow). Quantification of the percentage of pH3-positive/EdU-negative cells in control and confined MCTS showed that nearly 30% of mitotic cells were EdU-negative in the body of rod-shaped MCTS, while only about 5% of pH3-positive cells were EdU-negative in control spheroids and at the tips of mechanically stressed MCTS (Fig. 5C). This highly significant difference ($p < 0.0001$) indicates that EdU-negative mitotic cells (pH3 positive) had been in G2- or M-phase for at least 24 hours prior to fixation. Moreover, quantification of EdU-negative/pH3-positive cells in MCTS after 4 days of growth in confined conditions showed that only 11.4% of pH3-positive cells were EdU-negative in the spheroid body (data not shown). Analysis of the location of mitotically arrested cells within mechanically stressed MCTS showed that they were mostly found within the body of the spheroid, both in the peripheral and central regions (Fig. 5D). These findings indicate that pH3-positive/EdU-negative cells are progressively accumulated during growth in the confined environment of the PDMS microdevice and strongly suggest that growth-induced mechanical stress impairs mitotic progression in the body region of the MCTS.

External mechanical stress impairs bipolar spindle assembly

Establishment of a bipolar spindle is a prerequisite to achieve even mitotic segregation of chromosomes in daughter cells. When mitotic spindles are not correctly assembled, the mitotic checkpoint is activated and cells cannot undergo the metaphase-anaphase transition, leading to mitotic arrest [19]. To determine whether mitotic spindle bipolarity was affected in confined spheroids, the number of spindle poles in entire mitotic cells within MCTS was determined. To this aim, expression of γ Tubulin, a spindle pole component, was assessed in MCTS cryosections thick enough to identify entire cells (Fig. 6A). Confocal microscopy allowed the 3D visualization of spindle poles

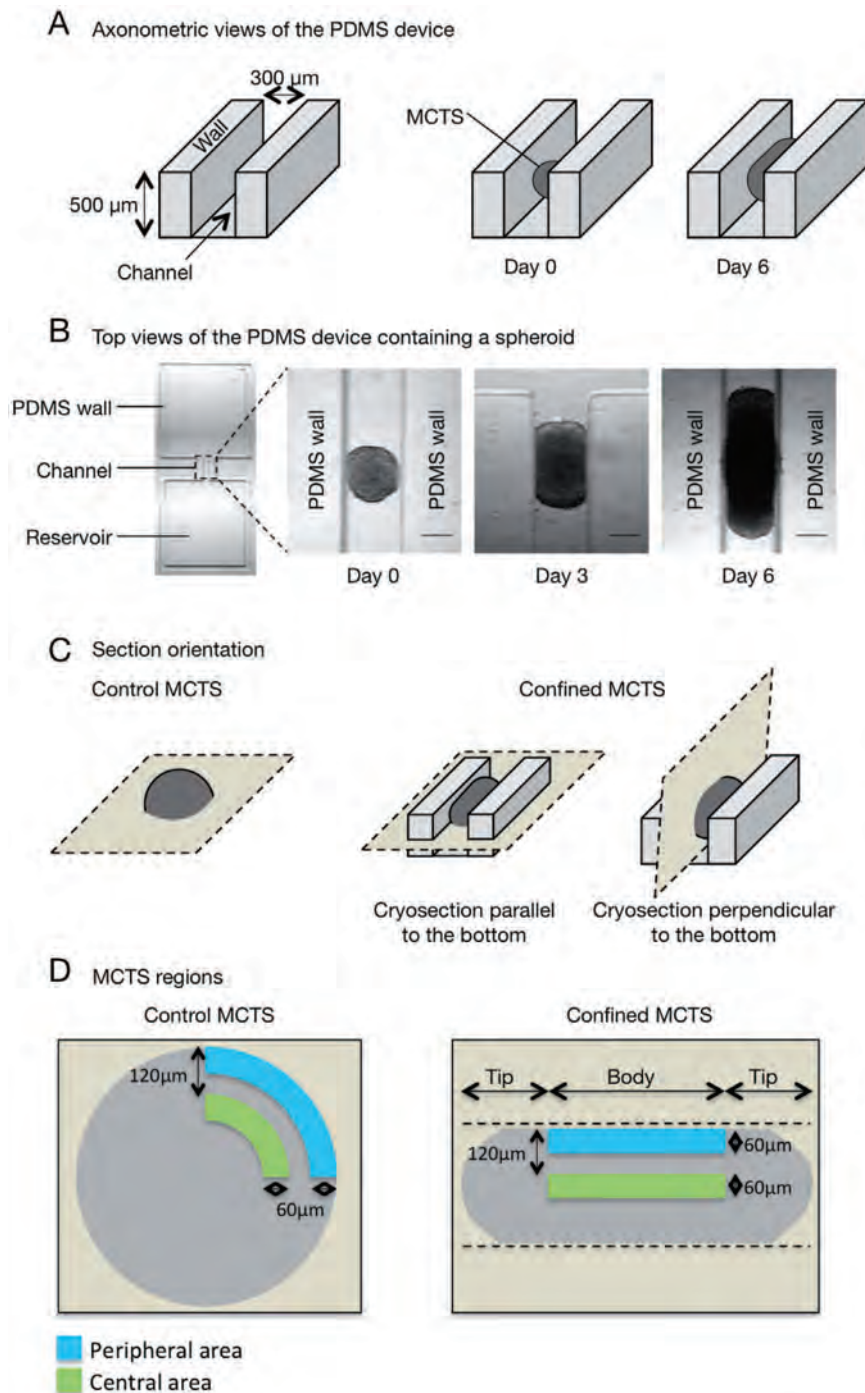


Figure 1. Experimental setup with PDMS devices. (A) Schematic representations (axonometric view) of the PDMS microdevice (left panel), of a spheroid that has just been placed in the PDMS microdevice (middle panel) and after 6 days of culture (right panel). (B) Transmitted-light images (top view) of a PDMS microdevice (left panel) and of a spheroid at day 0, day 3 and day 6 of growth within the microdevice (scale bar, 200 μ m). (C) Schematic representation of how control MCTS (grown in non-confined conditions) and mechanically confined MCTS (grown in the PDMS microdevice) were oriented for cryosectioning. (D) Schematic representations of sections of control and confined MCTS. The dashed lines indicate the PDMS walls. The peripheral area corresponds to a 60 μ m-width region along the surface of control MCTS or along the body walls of confined MCTS. The central area corresponds to a 60 μ m-width region 120 μ m away from the surface in control MCTS and from the PDMS walls in the body of confined MCTS.

doi:10.1371/journal.pone.0080447.g001

and chromosomes (Fig. 6A). In control MCTS, 89.7% of mitotic cells had two spindle poles. In contrast, in the body of mechanically confined spheroids only 63.6% of mitotic cells had two spindle poles, 22.7% only one and 9.1% three (Fig. 6B). The

pole-to-pole distance was similar in cells from control and confined spheroids when two poles were detected (Fig. 6C). This result indicates that in spheroids grown in a confined environment, mitotic spindle bipolarity establishment is locally impaired.

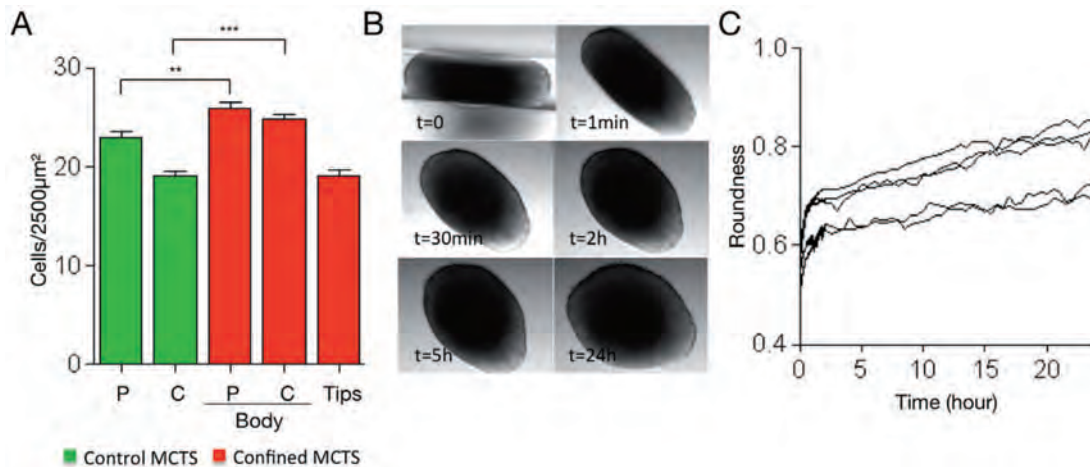


Figure 2. MCTS grown in PDMS microdevices are mechanically stressed. (A) Cell density in the peripheral (P) and central (C) areas of control MCTS (48 ROI analyzed from 15 MCTS obtained in 3 independent experiments) and in the body (56 ROI analyzed), and tips (39 ROI analyzed) of 6 confined MCTS from 3 independent experiments. The bars correspond to the mean \pm SEM. (B) Transmitted-light images of an MCTS were acquired at the indicated times after removal from the PDMS microdevice in which it was cultured for 6 days. Images are extracted from the time-lapse experiment (Zeiss Axiovert microscope) shown in Movie S1. (C) Change in roundness values of 5 MCTS (from 5 independent experiments) over time after removal from the PDMS microdevice in which they were cultured for 6 days. The roundness values were calculated as $4 \times (\text{area}) / (\pi \times (\text{major axis})^2)$ at each time point up to 24 hours after removal. A rapid swelling of the MCTS is observed just after the removal and then roundness increases more slowly.

doi:10.1371/journal.pone.0080447.g002

Growth in confined conditions does not affect mitotic cell rounding

As spindle defects and mitotic progression delay could be caused by failure of cells to round up [20], the morphology of mitotic cells was analyzed by incubating thick cryosections of control and mechanically confined MCTS with antibodies against pH3 and E-cadherin to identify the contours of entire mitotic cells (Fig. 7A). The area and circularity of interphase and mitotic cells were measured (Fig. 7B and C). Overall, mitotic cells had circularity values higher than interphase cells in both control and confined MCTS. Moreover, the circularity values of mitotic cells were similar in both conditions, demonstrating that, in multicellular tumor models, cells round up when they undergo mitosis. This result also indicates that mechanical confinement does not impair cell rounding at mitosis. Then, to test if rounding could be specifically impaired in mitotically arrested cells, cells were labeled with EdU to detect pH3-positive/EdU-negative cells as before (Fig. 7D). No significant difference in the area and circularity values of pH3-positive/EdU-negative and pH3-positive/EdU-positive cells was observed in confined MCTS (Fig. 7E). These data clearly demonstrate that growth-induced mechanical stress does not prevent mitotic cell rounding within the MCTS body and indicate that mitosis arrest and bipolar spindle assembly impairment in mechanically stressed MCTS are not due to a defect in cell rounding at mitosis.

Discussion

In addition to growth-induced solid or stored stress, which are generated by cell and matrix tumor components, reciprocal forces from the surrounding environment opposed to tumor growth also can contribute to the stress experienced by a tumor cell population. This type of stress can be designed as growth-associated (induced makes one think that is the growth causing the stress, whereas in reality is the external “obstacle” that limits growth) external mechanical stress.

In this study, we investigated the impact of a confined mechanical environment on cell proliferation in micro-tumors and our findings suggest that growth-associated external mechanical stress impairs mitosis progression.

As a paradigm we used MCTS, a model that accurately reproduces the 3D organization of a micro-tumor in vitro [16]. Studies devoted to the exploration of tissue mechanical properties have been performed on spheroids that were mechanically stressed by using parallel-plate tensiometry [21,22] or micropipette aspiration [23]. Various parameters such as surface tension or viscosity could be recorded, but very few studies addressed the impact of solid stress on cell proliferation within spheroids. Helmlinger and coworkers showed that isotropic solid stress produced by embedding MCTS within an agarose matrix led to spheroid growth inhibition with decreased apoptosis and slight reduction of cell proliferation [12]. In similar experiments, Cheng and collaborators reported that inhomogeneity in the mechanical properties of the confining environment could lead to morphological changes during tumor growth by inducing apoptosis in spheroid regions that are subjected to high compressive stress and by promoting proliferation in low-stress regions [11]. These studies indicated that solid stress influences tumor growth at both macroscopic and cellular levels. In the work reported here we attempted to explore further the impact of a confined mechanical environment on spheroids growth. To this aim, we analyzed by immunohistochemistry the MCTS cell response when grown in a dedicated PDMS microdevice we developed to generate growth-associated mechanical stress. After 6 days of culture within the PDMS channel, spheroids adopted an elongated rod shape with their longer axis parallel to the channel axis, in agreement with the previous reports [11,12]. This growth directionality was accompanied by modification of the hypoxia and proliferation gradients. Cell morphology data show that growth-associated mechanical stress under confinement induces modifications of the cell shape and organization within the body and the tip regions of spheroids. It is known, from various biological models, that cell geometry and organization is modified in response to mechanical forces

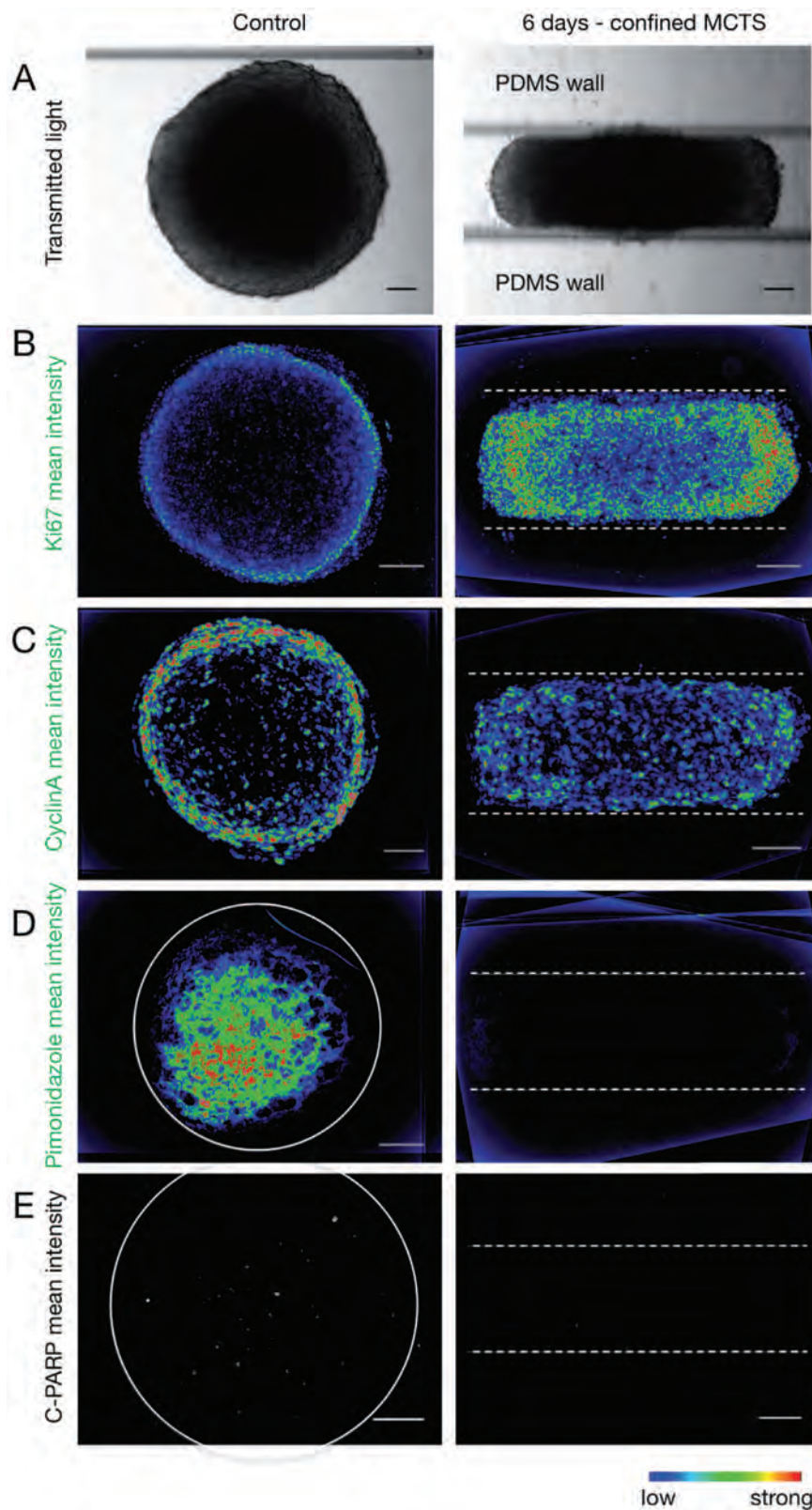


Figure 3. Proliferation, hypoxia and apoptosis within MCTS grown in PDMS microdevices. (A) Transmitted light images of control and confined MCTS grown in a PDMS microdevice for 6 days. (B) Detection by immunofluorescence of Ki67 staining (marker of proliferative cells). Mean fluorescence intensity of 10 cryosections from 4 different control MCTS (from 3 independent experiments) and of 6 cryosections from 4 mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS microdevice; from 3 independent experiments). (C) Detection by immunofluorescence of Cyclin A staining. Mean fluorescence intensity of 6 cryosections from 4 different control MCTS (from 3 independent experiments) and of 6 cryosections from 4 mechanically confined MCTS (from 3 independent experiments). (D) Detection by immunofluorescence of hypoxia (pimonidazole; in green). Mean fluorescence

intensity of 8 cryosections from 8 different control MCTS (from 3 independent experiments) and of 8 cryosections from 6 mechanically confined MCTS (from 4 independent experiments). The grey circle indicates the MCTS margins. (E) Cleaved PARP staining (apoptosis marker). Mean fluorescence intensity of 6 cryosections from 6 control MCTS (two independent experiments) and of 6 cryosections from 6 mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device; 4 independent experiments). c-PARP, cleaved PARP. The grey circle indicates the MCTS margins. (A–E) The dashed lines indicate the PDMS walls. (A–D) The color scale indicates the fluorescence intensity (scale bar, 100 μm). Nuclei are stained by DAPI (blue).
doi:10.1371/journal.pone.0080447.g003

occurring during growth and morphogenesis [24]. These cell morphology parameters are closely related to cell-cell contacts and cell-cell signaling, which are important for the mechanical regulation of cell physiology. In the spheroid model, modification of cell density could affect cell-cell contacts and this might contribute to the specific cell features observed in confined spheroids. More advanced cellular and molecular techniques are required to investigate this hypothesis.

In addition and strikingly, growth-associated mechanical stress resulted in mitotic defects. Cell division is a crucial step and its accuracy relies on spatially and temporally tightly controlled

mechanisms. Positioning of the mitotic cleavage plane depends on the interaction of the cell with the extracellular environment [25] and with neighboring cells [26–28]. Moreover, several studies showed that cell rounding, a common feature of cell division that relies on hydrostatic pressure and cell cortex forces [29], is a key parameter for correct mitosis progression [30–32]. As cell shape and interaction with the microenvironment rely on and can be modeled by forces, all these data emphasize the importance of mechanical cues on cell division. Mechanical confinement has been shown to impair mitotic cell rounding and to induce aberrant cell division [33,34]. However, all these results were obtained

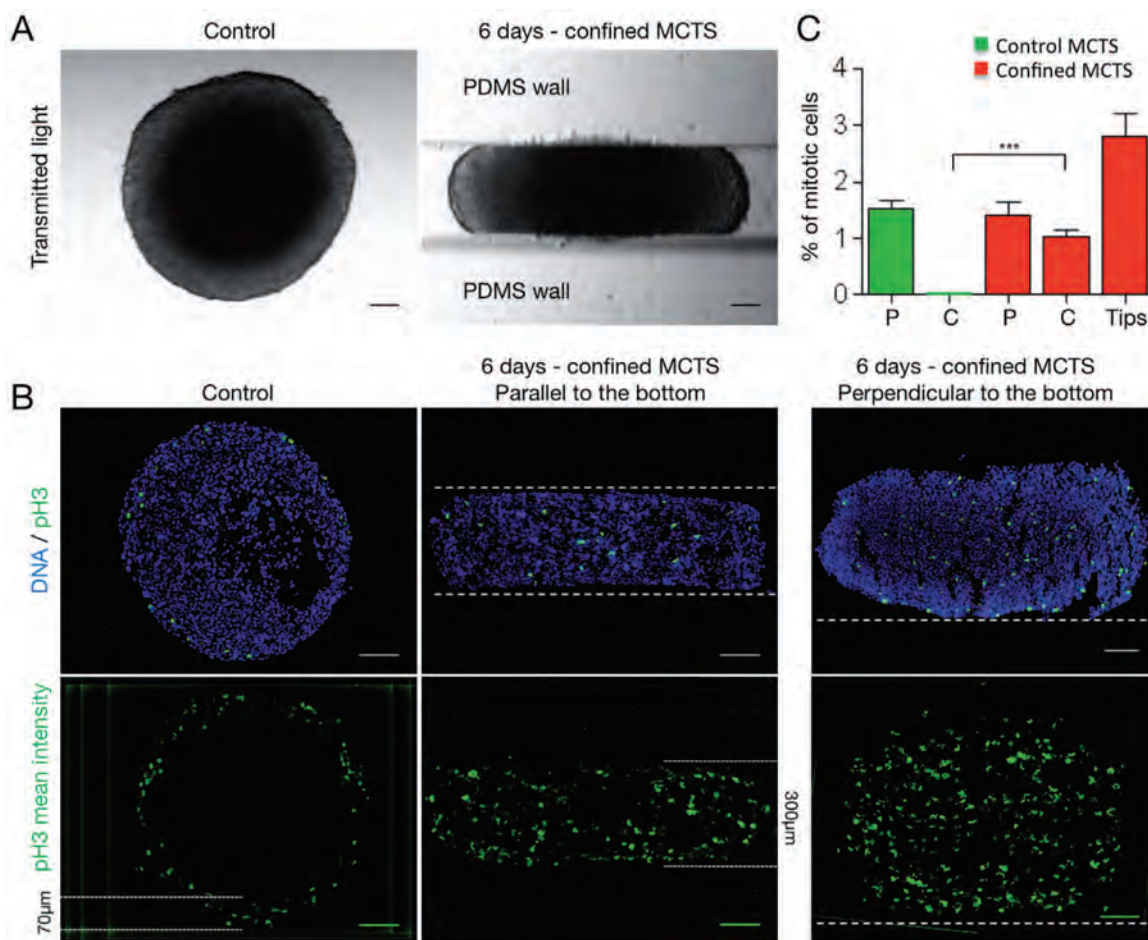


Figure 4. Mechanically confined growth impairs the regionalization of mitotic cells in MCTS. (A) Transmitted light images of a control MCTS and of a MCTS grown in a PDMS microdevice for 6 days. (B) Upper panels: Detection by immunofluorescence of mitotic cells (anti-phosphorylated Histone H3 antibody, pH3; in green) in cryosections of a control MCTS and a mechanically confined MCTS. The orientation of mechanically confined MCTS cryosections is parallel to the bottom of the channel (middle, see also Fig 1C) and perpendicular to the bottom of the channel (right, see also Fig 1C). Nuclei are stained with DAPI (blue). Lower panels: mean fluorescence intensity of pH3 staining in 8 cryosections from 6 control MCTS (3 independent experiments), 11 parallel cryosections from 11 mechanically confined MCTS (4 independent experiments) and 8 perpendicular cryosections from 6 mechanically confined MCTS (3 independent experiments). Dashed lines represent the walls of the PDMS channel. White lines indicate the width of the area where mitotic cells are localized (scale bar, 100 μm). (C) Percentages of mitotic cells (pH3-positive cells) in the peripheral (P) and the central (C) areas of control MCTS ($n = 14$ areas analyzed, from 7 MCTS from 3 experiments) and in the peripheral (P) and central (C) areas and the tips (Tips) of confined MCTS ($n = 29$ areas analyzed, from 12 MCTS from 6 experiments). The bars correspond to the mean \pm SEM.
doi:10.1371/journal.pone.0080447.g004

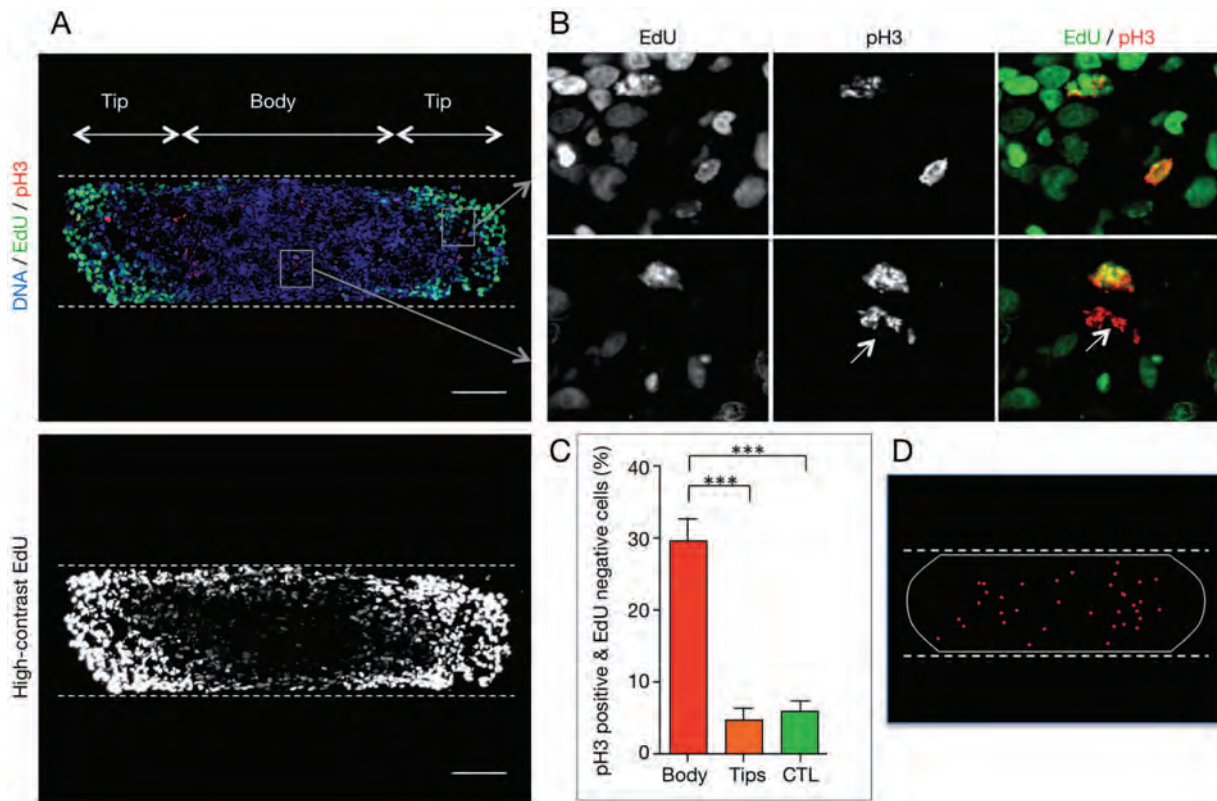


Figure 5. Growth-associated external mechanical stress leads to accumulation of cells arrested in mitosis. (A) Upper panel: Immunodetection of EdU incorporation (green) and mitotic cells (pH3-positive, red) in a cryosection from MCTS grown in PDMS microdevices for 6 days. Nuclei are stained using DAPI (blue). Lower panel: High-contrast image of the immunodetection of EdU incorporation (white) (scale bar, 100 μ m). (B) Analysis of EdU incorporation in mitotic cells. Images correspond to magnifications of the regions indicated by the white squares in A from the tip (top panels) and the body (bottom panels) of a mechanically confined MCTS. The white arrow indicates a pH3-positive cell that is not EdU-positive. This cell is next to a pH3-positive/EdU-positive cell. (C) Percentage of pH3-positive/EdU-negative cells in the body (589 mitotic cells from 48 cryosections) and in the tips (331 mitotic cells from 95 cryosections) of mechanically confined MCTS (20 MCTS from 4 independent experiments) and in control (CTL) MCTS (358 mitotic cells from 34 cryosections from 15 MCTS from 4 independent experiment). Bars correspond to the mean \pm SEM. (D) Map showing the localization of pH3-positive/EdU-negative cells in 8 cryosections from 8 mechanically confined MCTS from 4 independent experiments. The white line represents the outline of the MCTS and the red dots the localization of the pH3-positive/EdU-negative cells. The dashed lines indicate the microdevice PDMS walls.
doi:10.1371/journal.pone.0080447.g005

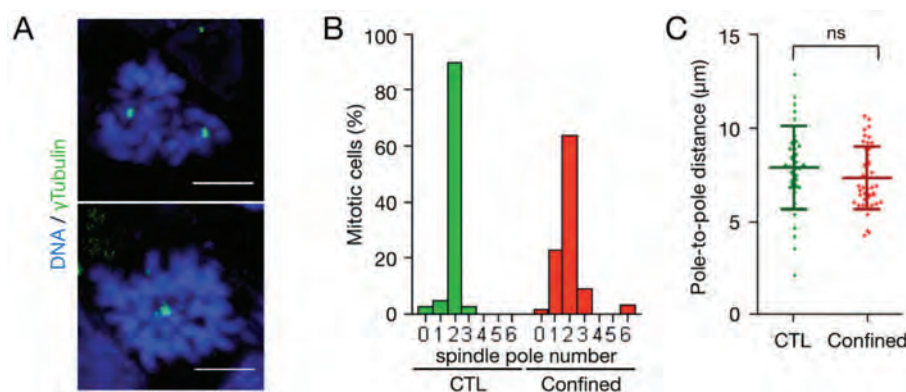


Figure 6. Mechanically confined MCTS show bipolar spindle defects. (A) Maximal projection of two mitotic cells from two z-stacks of images of a cryosection from a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS microdevice) incubated with an anti- γ Tubulin antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue) (scale bar, 5 μ m). (B) Distribution (percentage) of mitotic cells as a function of the number of spindle poles in control MCTS (CTL, 37 mitotic cells analyzed from 10 MCTS from 3 independent experiment) and in the body of mechanically confined MCTS (Confined, 66 mitotic cells analyzed from 8 MCTS from 4 independent experiment). (C) Distribution of the pole-to-pole distance (in μ m) in bipolar mitotic cells from the control (CTL) and mechanically confined (Confined) MCTS analyzed in (B). The lines correspond to the mean \pm SD.
doi:10.1371/journal.pone.0080447.g006

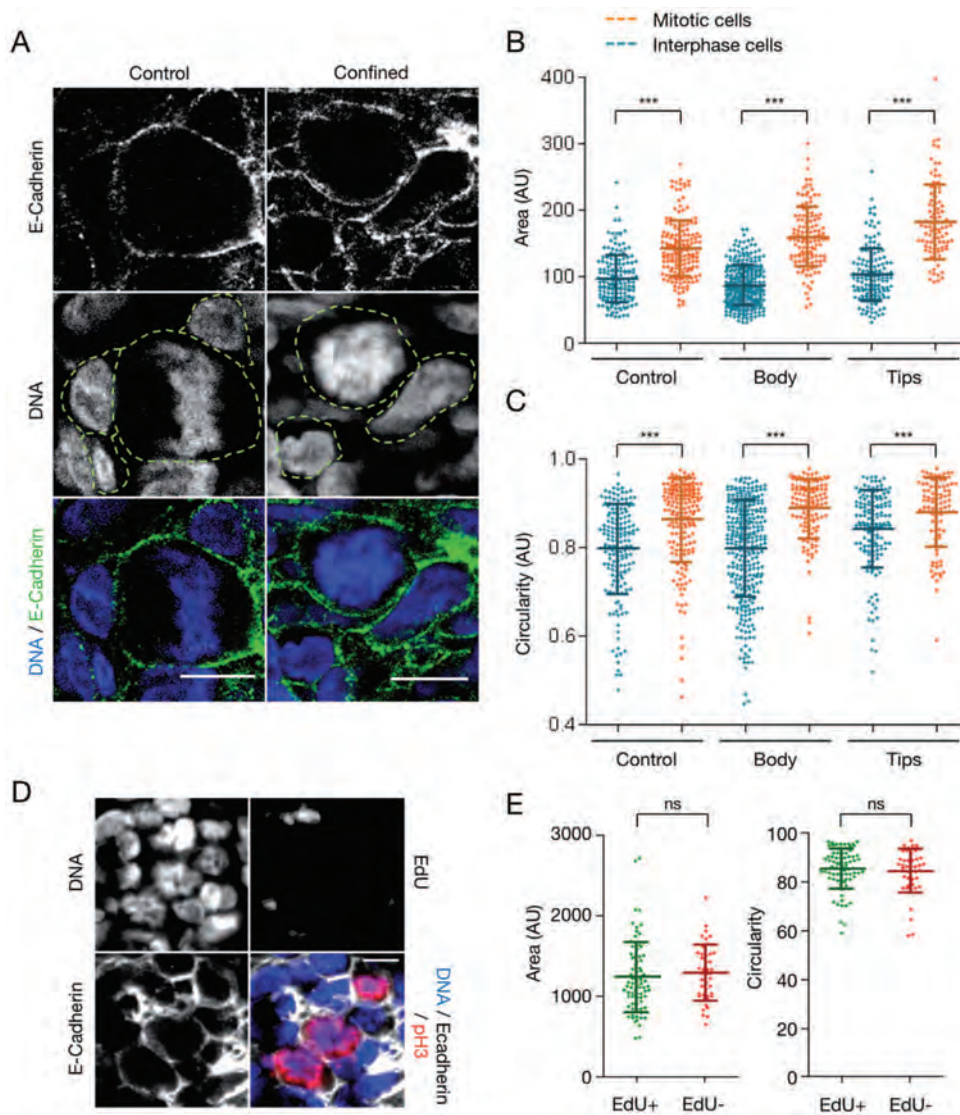


Figure 7. Mechanical confinement does not impair mitotic cell rounding within MCTS. (A) Cryosections of a control MCTS and a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device), stained for DNA (blue) and E-Cadherin (green) (scale bar, 10 μ m). The cell outlines are drawn manually (green dashed line) to extract the area and the circularity of cells. (B) Area values of interphase cells (blue) and mitotic cells (orange) in control MCTS and in the body and tips of mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS microdevice). Lines correspond to the mean \pm SD. (C) Circularity values of interphase cells (blue) and mitotic cells (orange) in control MCTS and in the body and tips of mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS microdevice). The error bars represent the mean \pm SD. For control MCTS, 167 interphase cells and 175 mitotic cells were analyzed from 8 MCTS from 2 experiments. For confined MCTS, 307 interphase cells and 125 mitotic cells were analyzed in the body, and 146 interphase cells and 91 mitotic cells were analyzed in the tip, both from 10 MCTS from 4 experiments. (D) Cryosections of a mechanically confined MCTS stained for DNA (blue), E-Cadherin (grey), EdU (green) and pH3 (red) (scale bar, 10 μ m). (E) Area (left panel) and circularity (right panel) values of pH3-positive mitotic cells in the body of mechanically confined MCTS relative to EdU incorporation (EdU+/pH3+: 79 cells analyzed, EdU-/pH3+: 43 cells analyzed, from 3 MCTS from 2 independent experiments). The lines correspond to the mean \pm SD.

using 2D cell models or simple epithelia, and little is known about the impact of such mechanical stress on cell division control within tumors. The present study demonstrates that mitotic cell rounding is not impaired within tumor spheroids cultured in growth-associated stress conditions and that therefore it might not be involved in the observed mitotic progression delay and mitotic spindle defect. This result is not in agreement with a recent report that shows a strong interplay between cell rounding at mitosis and mitotic progression [33]. However, in this study isolated cells were used, whereas we analyzed this interplay in a multicellular model and in experimental conditions that mimic the behavior of a growing micro-tumor in an anisotropic mechanical environment

resulting from tissue stiffness differences. On the other hand, in such 3D model it is more difficult to identify the involved molecular players. Understanding the discrepancies between our results and previous literature data will require functional studies based on loss-of-function experiments using pharmacological or siRNA approaches that are currently under development.

Materials and Methods

Cell culture and spheroid generation

HCT116 colorectal cancer cells (ATCC) were cultured in DMEM (Invitrogen) containing 10% FCS with 2 mM/l glutamine

and penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Spheroids were prepared as previously described [18,35]. Briefly, 500 cells/well were distributed in poly-HEMA-coated 96-round bottom well plates. Plates were centrifuged (300 g for 6 min) and then placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

PDMS device

Polydimethylsiloxane (PDMS) is gas-permeable polymer, non-toxic and considered as inert. We designed a channel-shape device (Fig. 1) with reservoirs on both side to ensure homogeneous feeding of the spheroids. PDMS was first degassed in a vacuum chamber then poured on a silicium wafer (LAAS technical facility). After a second degassing, PDMS was heated at 80°C for 6 hours. PDMS was then peeled off from the wafer to make the molded devices in which spheroids were transferred when they measured about 300 µm in diameter.

Immunofluorescence on cryosections

Spheroids in free suspension or in PDMS microdevices were fixed in formalin (Sigma) for 2–3 hrs, then washed with PBS and stored at 4°C. After fixation, spheroids alone or within the PDMS microdevice were incubated in 15% and then 30% sucrose in PBS at 4°C for 24 h, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek) and then 7 µm- or 15 µm-thick cryosections were cut. After blocking in PSB/1% BSA/0.5% Triton, sections were incubated with antibodies against Ki67 (rabbit polyclonal, Santa Cruz, 1/200 at 4°C, overnight), cleaved PARP (rabbit monoclonal, Epitomics, 1/1000 at 37°C, for 1 h), phosphorylated HistoneH3 (rabbit polyclonal, Millipore, 1/2000 at 37°C, for 1 h), E-Cadherin (mouse polyclonal, Abcam, 1/200 at 4°C, for 72 h) or γTubulin (mouse polyclonal, Sigma, 1/5000 at 4°C, for 72 h). After washes in PBS/0.1% Triton v/v, the secondary antibody was added for 1 h (anti-mouse or anti-rabbit conjugated with Alexa 488, Alexa 594 or Alexa647, Molecular Probes, 1/800, at room temperature). DNA was stained using DAPI. An initial antigen retrieval step (boiling in a solution containing 2 mM citric acid and 8 mM sodium citrate for 3×7 min) was included for the anti-Ki67 and -E-Cadherin antibodies.

For hypoxia detection, spheroids were incubated at 37°C with 100 µM pimonidazole for 2 hours prior to fixation. The hypoxic regions were revealed on cryosections by incubation with the FITC-conjugated MAb1 for 2 h (Hypoxyprobe™-1 Plus Kit, HPI; 1/300 at 37°C).

EdU labeling of spheroids

EdU labeling was performed by using the Click-iT® EdU Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes). EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) is a thymidine analog that is incorporated into newly synthesized DNA. EdU was added to the culture medium to a final concentration of 10 µM. After 24 h incubation, spheroids were rinsed in PBS and fixed. EdU detection, based on a specific click reaction between EdU and the Alexa FLuor® 488 or 594 dye, was performed following the manufacturer's instructions.

Images acquisition and analysis

Transmitted light images of spheroids were acquired using a MacroFluo Z16 APO microscope (Leica) fitted with a CoolSNAP ES2 CCD camera (Roper). Time-lapse data of spheroids were acquired using a widefield microscope (Zeiss) with a 10X objective (NA 0.3). Roundness analyses were performed using the Cellomics Technologies software (Compartimental Bioapplication-Thermo Scientific). Briefly, the outline of the spheroid was automatically

detected and its roundness was calculated by the software. Fluorescence images of 7 µm-spheroid sections were acquired using a DM5000 (Leica) epifluorescence microscope, fitted with a Roper COOLsnap ES CCD camera. Images were processed using the Metavue and ImageJ software packages. The intensity averaging corresponds to the calculation of the average intensity of each pixel in the entire stack. It results in the production of an image showing the average spatial distribution of the antibody of interest. Cell counting was performed manually. Fluorescence images of 15 µm-spheroid sections were acquired using a LSM510 NLO multiphoton confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) and a 63X objective. Imaging of immunofluorescence experiments involved the sequential use of 488- and 594-nm lasers and an IR pulsed laser at 750 nm for DAPI. Images were processed using the Zen 2009 software (Zeiss). Cell shape and cell density analyses were performed using ImageJ plugins. The cell outlines were drawn manually and the ROI geometrical parameters were given by the software. The density analyses were performed by counting the number of cell in ROI of 2500 µm². Cell polarity analyses were done using the Imaris 7.0.0 software (Bitplane).

Statistical analyses

Distribution, histograms and the Wilcoxon Mann-Whitney test were performed using the Microsoft Excel and Prism software packages.

Supporting Information

Figure S1 Proliferation, hypoxia and apoptosis within MCTS grown in PDMS microdevices. (A) Transmitted light images of a control MCTS and a MCTS grown in a PDMS microdevice for 6 days. (B) Detection by immunofluorescence of proliferative cells (Ki67; in green) in cryosections from a control MCTS and a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device); nuclei are stained by DAPI (blue) (representative fluorescence image). (C) Detection by immunofluorescence of cells in the G1 phase of the cell cycle (Cyclin A; in red) in cryosections from a control MCTS and a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device). Nuclei are stained by DAPI (blue) (representative fluorescence image). (D) Detection by immunofluorescence of hypoxia (pimonidazole; in green) in cryosections from a control MCTS and a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device). Nuclei are stained by DAPI (blue) (representative fluorescence image). (E) Detection by immunofluorescence of apoptotic cells (c-PARP; in red) in cryosections from a control MCTS and a mechanically confined MCTS (6 days in the PDMS device). Nuclei are stained by DAPI (blue) (representative fluorescence image). Scale bar, 100 µm. The dashed lines indicate the PDMS walls. (F) Plot profiles of the mean Ki67 (top) and Cyclin A (bottom) fluorescence intensity from Figure 3B and C, respectively. For each antibody, the fluorescence intensity corresponded to the average intensity in a 50 µm-wide ROI spanning along the diameter of control MCTS (green) or along the major axis (red) of mechanically confined MCTS, as shown in the schematic representation of MCTS (upper panel). (EPS)

Movie S1 MCTS removal from the PDMS microdevice. Time-lapse analysis (image acquisition in transmitted-light) of a spheroid removed from the PDMS microdevice and grown in suspension (Zeiss Axiovert microscope, 10X objective). The movie starts one minute after the removal from the microdevice and covers a period of 5.5 hours. (AVI)

Acknowledgments

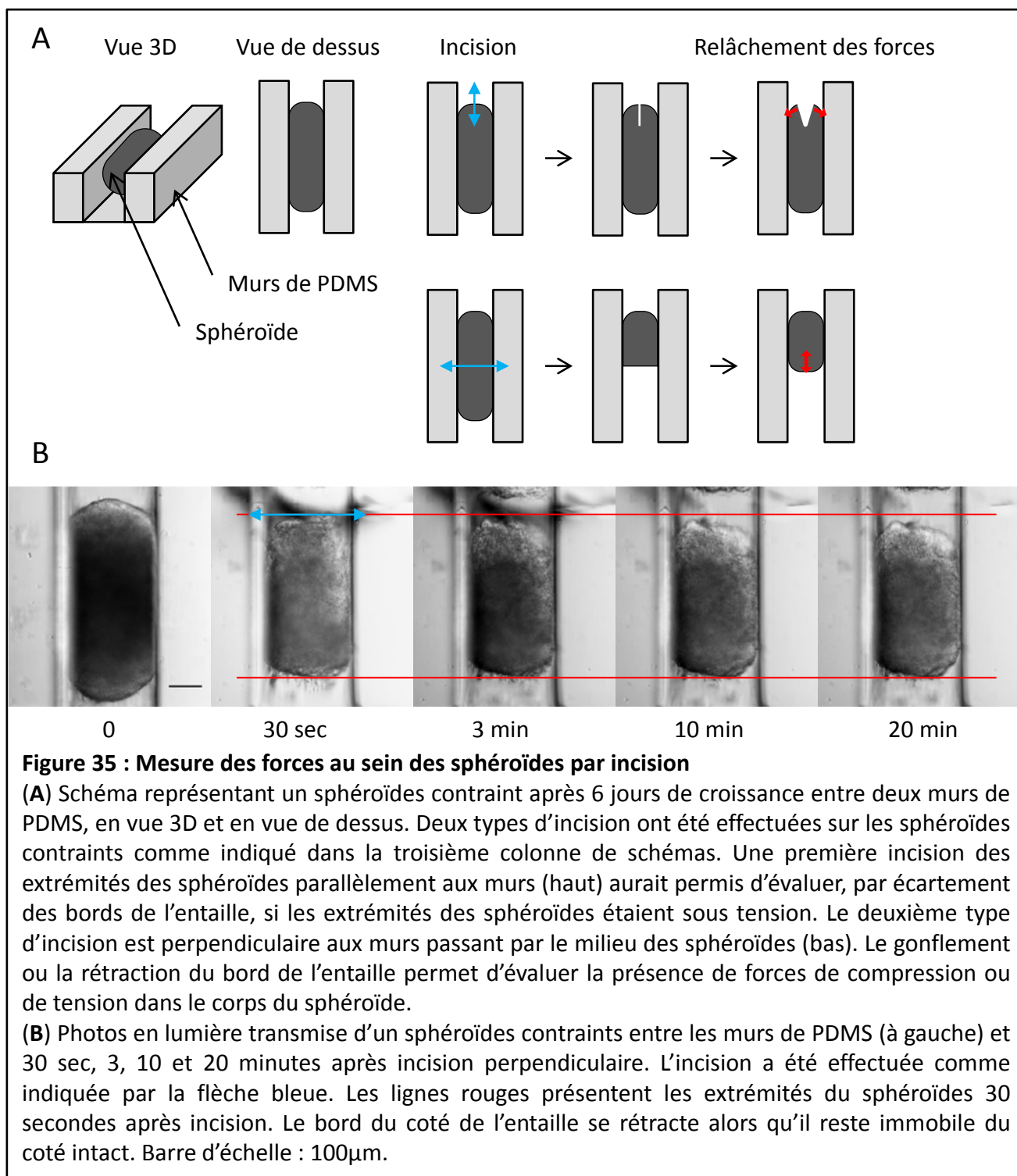
We are grateful to the members of our group for discussions and support of this project. The authors thank M. Thery and L. Haren for their comments on the manuscript and D. Bourgeois for his help. The authors wish to acknowledge the TRI-Genotoul and ITAV imaging facilities.

References

- Correia AL, Bissell MJ (2012) The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 15: 39–49.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674.
- Butcher DT, Alliston T, Weaver VM (2009) A tense situation: forcing tumour progression. *Nature reviews Cancer* 9: 108–122.
- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC (2011) The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature reviews Cancer* 11: 512–522.
- Yu H, Mouw JK, Weaver VM (2011) Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends in cell biology* 21: 47–56.
- DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM (2011) Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 12: 308–319.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, et al. (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891–906.
- Hofmann M, Guschel M, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, et al. (2006) Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. *Neoplasia* 8: 89–95.
- Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, et al. (2012) Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 911–916.
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, et al. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* 8: 241–254.
- Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL (2009) Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One* 4: e4632.
- Helminger G, Netti PA, Lichtenbeld HC, Melder RJ, Jain RK (1997) Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature biotechnology* 15: 778–783.
- Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, et al. (2008) Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & development* 22: 2189–2203.
- Thery M, Jimenez-Dalmaroni A, Racine V, Bornens M, Julicher F (2007) Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447: 493–496.
- Desoize B, Jardillier J (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 36: 193–207.
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, et al. (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology* 148: 3–15.
- Sutherland RM (1988) Cell and environment interactions in tumor micro-regions: the multicell spheroid model. *Science* 240: 177–184.
- Laurent J, Frongia C, Cazales M, Mondésert O, Ducommun B, et al. (2013) Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer* 13.
- Foley EA, Kapoor TM (2013) Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews Molecular cell biology* 14: 25–37.
- Piel M, Joanny JF (2011) [The rounding of mitotic cells]. *Medecine sciences: M/ S* 27: 590–592.
- Foty RA, Pflieger CM, Forgacs G, Steinberg MS (1996) Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* 122: 1611–1620.
- Marmottant P, Mgharbel A, Kafer J, Audren B, Rieu JP, et al. (2009) The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 17271–17275.
- Guevorkian K, Gonzalez-Rodriguez D, Carlier C, Dufour S, Brochard-Wyart F (2011) Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 13387–13392.
- Guillot C, Lecuit T (2013) Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis. *Science* 340: 1185–1189.
- Thery M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, et al. (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7: 947–953.
- Gibson WT, Veldhuis JH, Rubinstein B, Cartwright HN, Perrimon N, et al. (2011) Control of the mitotic cleavage plane by local epithelial topology. *Cell* 144: 427–438.
- Minc N, Burgess D, Chang F (2011) Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell* 144: 414–426.
- Odde D (2011) Getting cells and tissues into shape. *Cell* 144: 325–326.
- Stewart MP, Helenius J, Toyoda Y, Ramanathan SP, Muller DJ, et al. (2011) Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469: 226–230.
- Carreno S, Kouranti I, Glusman ES, Fuller MT, Echard A, et al. (2008) Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *The Journal of cell biology* 180: 739–746.
- Kunda P, Pelling AE, Liu T, Baum B (2008) Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Current biology: CB* 18: 91–101.
- Kunda P, Baum B (2009) The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends in cell biology* 19: 174–179.
- Lancaster OM, Le Berre M, Dimitracopoulos A, Bonazzi D, Zlotek-Zlotkiewicz E, et al. (2013) Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Developmental cell* 25: 270–283.
- Tse HT, Weaver WM, Di Carlo D (2012) Increased asymmetric and multi-daughter cell division in mechanically confined microenvironments. *PloS one* 7: e38986.
- Ivascu A, Kubbies M (2006) Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of biomolecular screening* 11: 922–932.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AD VL BD. Performed the experiments: AD CF. Analyzed the data: AD BD VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: KG. Wrote the paper: VL BD AD.

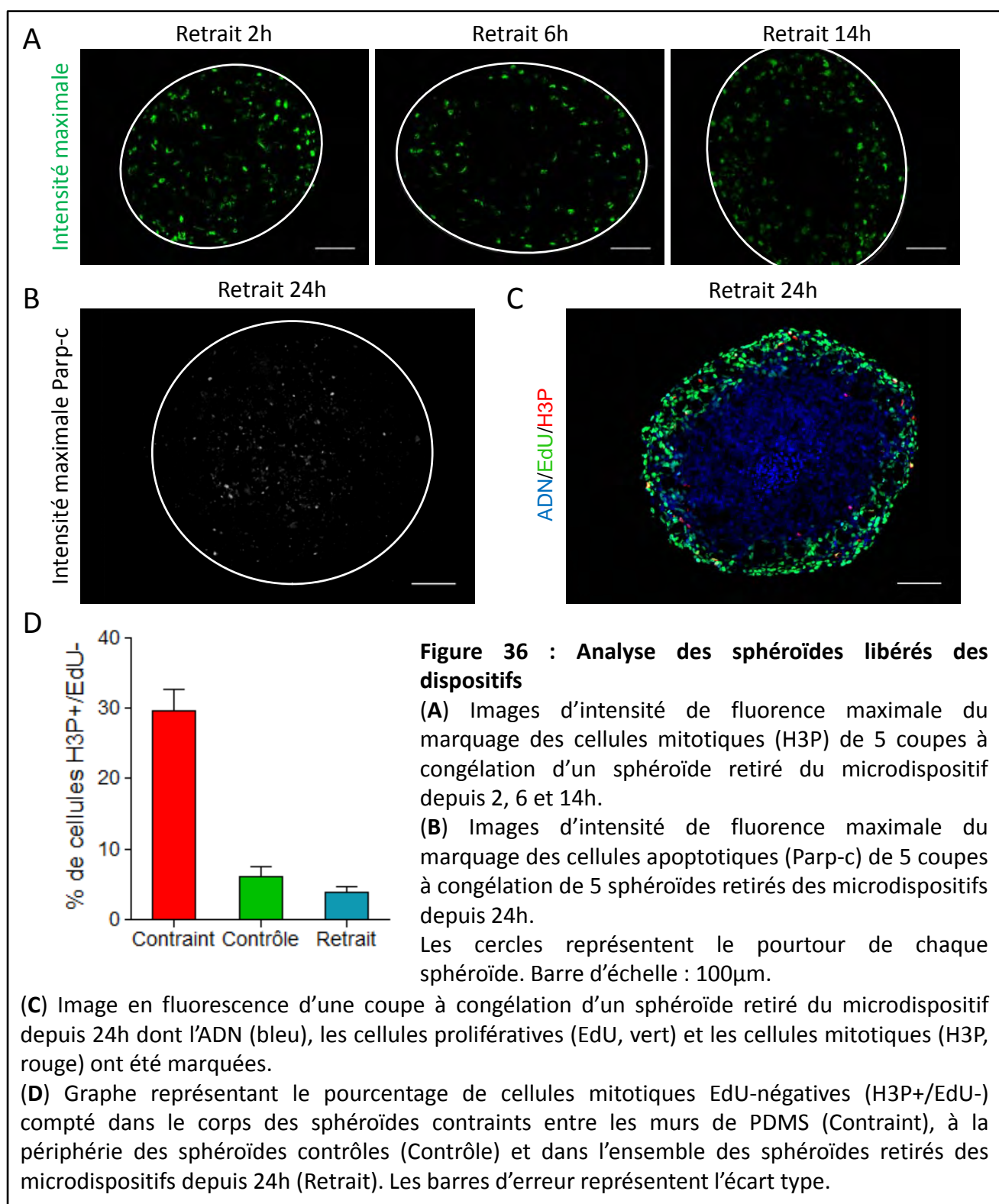


3) Résultats complémentaires

a) Analyse de la tension des sphéroïdes contraints

Le groupe de G. Forgacs et M.S. Steinberg [188] ont mis au point la mesure des propriétés viscoélastiques des agrégats par compression entre deux plaques parallèles. Suite à une compression courte en durée, les propriétés élastiques de l'agrégat lui permettent de retendre rapidement vers sa forme initiale. Suite à une compression prolongée, cette phase rapide de relâchement élastique est suivie d'un relâchement plus lent et plus long associé à un réarrangement cellulaire jusqu'à ce que l'équilibre des forces au sein du sphéroïde soit atteint. Lors du retrait des sphéroïdes des microdispositifs, nous observons également ces deux phases (**Figure 2B et 2C** de l'article). Le premier relâchement rapide signifie que les sphéroïdes étaient effectivement comprimés entre les murs de PDMS. Cependant, cette méthode ne permet pas de quantifier le niveau de compression subit par les cellules des sphéroïdes, ni la résistance réciproque exercée par les sphéroïdes sur les murs de PDMS.

Nous avons tenté de mettre en évidence les tensions et/ou compressions au sein des sphéroïdes dans les microdispositifs en réalisant des incisions des sphéroïdes contraints et en analysant le relâchement induit (**Figure 35A**), de façon similaire aux expériences réalisées par le groupe de R.K. Jain [39] (**Figure 8**). L'incision des extrémités des sphéroïdes contraints parallèlement aux murs aurait pu révéler une tension circonférentielle des extrémités. Mais celle-ci, en s'accompagnant d'une sortie quasiment systématique des sphéroïdes d'entre les murs, empêchait l'analyse de l'écartement des bords de l'entaille. L'incision des sphéroïdes perpendiculairement aux murs passant par le milieu des sphéroïdes permettrait de révéler une tension des cellules par rétraction des sphéroïdes, ou une compression des sphéroïdes par gonflement du bord de l'entaille. Effectivement, la rétraction des bords incisés a été observée plusieurs fois (**Figure 35B et Film2**) et suggère que les cellules du corps des sphéroïdes contraints sont sous tension orientée parallèlement aux murs. Cependant, le gonflement du bord de l'entaille n'a pas pu être observé parce que les incisions, faites manuellement, n'étaient pas parfaitement verticales. L'extraction de résultats solides aurait nécessité le développement d'une technique de coupe automatique.



b) Analyse des gradients des sphéroïdes libérés des dispositifs

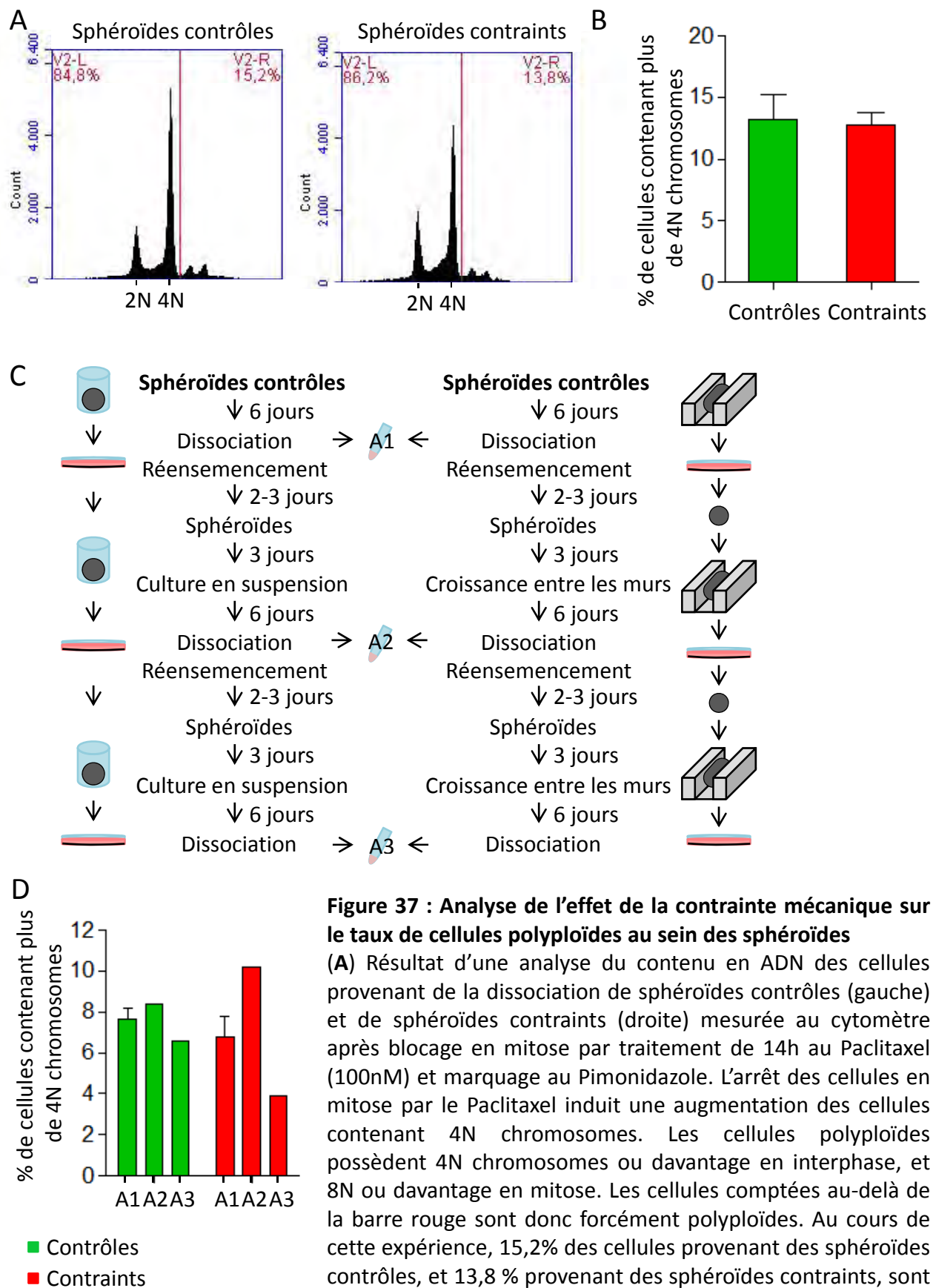
Afin d'analyser le devenir des cellules au sein des sphéroïdes lorsqu'ils sont retirés des microdispositifs, le pourcentage de cellules mitotiques EdU négatives a été compté sur coupes à congélation de sphéroïdes retirés des microdispositifs depuis 24h. Le pourcentage de cellules mitotiques EDU-négatives chute en 24h jusqu'au niveau des sphéroïdes contrôles (**Figure 36D**, n=49 de 15 sphéroïdes issus de 4 expériences indépendantes). Le changement d'environnement des sphéroïdes impacte sur le comportement de ces cellules mitotiques, mais également sur l'organisation globale des sphéroïdes. En effet, le retour à une forme sphérique des sphéroïdes s'accompagne de la mise en place rapide des gradients d'oxygène et de nutriments, desquels résultent la redistribution des zones prolifératives exclusivement en périphérie et l'apparition d'un cœur nécrotique en moins de 24h (**Figure 36B-C**). Cette réorganisation se met en place progressivement, comme le montre la disparition progressive des cellules mitotiques au centre des sphéroïdes retirés des murs au fur et à mesure de leur relâchement (**Figure 36A**). Ces observations effectuées sur coupes à congélation ne permettent pas de déterminer le devenir des cellules arrêtées en mitose. Seule une analyse dynamique de la progression en mitose permettrait de suivre le devenir de ces cellules mitotiques.

c) Analyse de l'impact des contraintes mécaniques sur l'hétérogénéité génétique au sein des sphéroïdes

La contrainte mécanique, en allongeant la durée de progression en mitose, pourrait induire des défauts de ségrégation des chromosomes ou de division. Afin de vérifier cette hypothèse, des analyses de la polyploïdie et de l'aneuploïdie accumulées au sein des sphéroïdes contrôles et contraints ont été réalisées.

i. Analyse de la polyploïdie

Brièvement, les sphéroïdes ont été dissociés et réensemencés dans des boîtes de pétri. Les cellules ont été traitées 14h au Paclitaxel pour induire une accumulation en mitose, et différencier les cellules euploïdes en G2 comportant 4N chromosomes, des cellules polyploïdes en G1 comportant 4N chromosomes. Le marquage des cellules avec l'Iodure de



Propidium a permis de mesurer leur contenu en ADN. La quantité de cellules polyploïdes a été évaluée à partir du pourcentage de cellules possédant plus de 4N chromosomes (**Figure 37A** et **37B**). Cependant, sur deux expériences indépendantes, aucune différence du pourcentage de polyploïdie n'a été mise en évidence entre les cellules provenant des sphéroïdes contrôles (13,2 +/- 2,8%) et celles des sphéroïdes contraints (12,8 +/- 1,5%).

Dans le cas où l'accumulation de cellules polyploïdes ne pouvait pas être mesurée car ce phénomène était trop faible, une amplification de l'hétérogénéité cellulaire a été mise en place. Pour cela, les mêmes cellules dissociées des sphéroïdes contrôles et contraints ont été réutilisées après réensemencement pour refaire des sphéroïdes contrôles et contraints respectivement. Ce protocole détaillé dans la **figure 37C** a été effectué deux fois et à chaque réensemencement, les cellules polyploïdes ont été analysées en cytométrie comme précédemment (sans traitement au Paclitaxel). Les mesures (**Figure 37D**) ne montrent pas de tendance de variation du pourcentage de cellules polyploïdes induite par la contrainte mécanique au fur et à mesure des réensemencements.

ii. Analyse de l'aneuploïdie

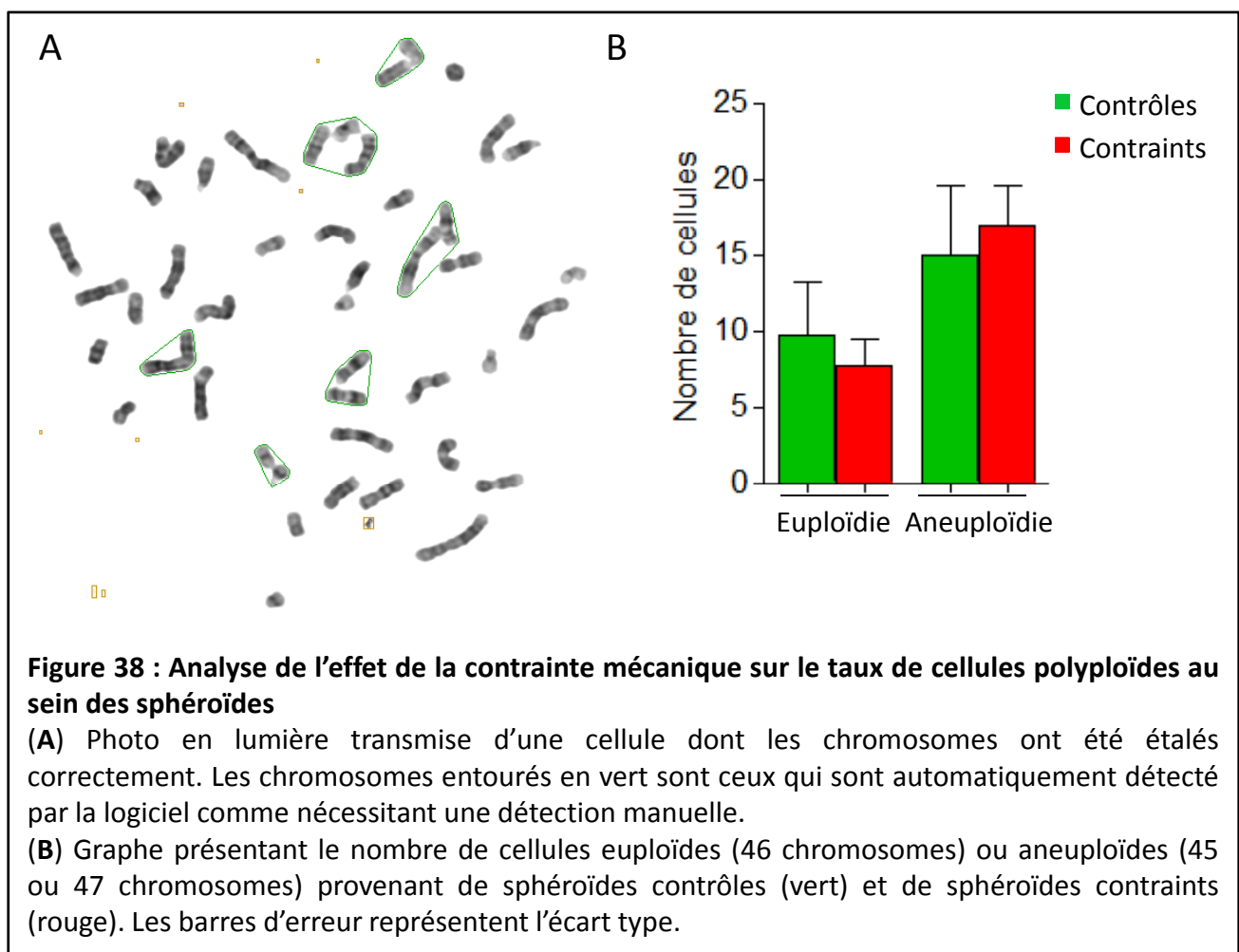
L'aneuploïdie a été analysée par étalement des chromosomes et analyse des caryotypes. Le protocole d'étalement des cellules pour l'analyse est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes. Le contenu en chromosomes de 74 cellules respectivement issues de la dissociation de sphéroïdes contrôles et de celle des sphéroïdes contraints (3 expériences indépendantes) a pu être précisément déterminé (**Figure 38B**). Le nombre de cellules euploïdes (46 chromosomes) et aneuploïdes (45 ou 47 chromosomes) a été déterminé.

Figure 37 (suite de la légende) :

(B) Graphe présentant le pourcentages de cellules possédant plus de 4N chromosomes comptées dans les cellules provenant de sphéroïdes contrôles (vert) et de sphéroïdes contraints (rouge). Les barres d'erreur représentent l'écart type.

(C) Protocole d'amplification de l'hétérogénéité cellulaire en réensemencant des cellules provenant de la dissociation de sphéroïdes contrôles (à gauche) ou de sphéroïdes contraints (à droite). Après chaque dissociation et réensemencement, des cellules sont prélevées et analysées au cytomètre après marquage au Iodure de Propidium (successivement A1, A2 et A3).

(D) Graphe présentant le pourcentages de cellules possédant plus de 4N chromosomes comptées dans les cellules provenant de sphéroïdes contrôles (vert) et de sphéroïdes contraints (rouge) après un (A1), deux (A2) ou trois (A3) passage sous forme de sphéroïdes. Les barres d'erreur représentent l'écart type.



Seules 6 cellules aneuploïdes supplémentaires ont été observées dans les cellules provenant des sphéroïdes contraints par rapport aux cellules provenant des sphéroïdes contrôles. Cette différence n'est donc pas significative, mais peut suggérer une tendance d'augmentation de l'aneuploïdie sous l'effet des contraintes mécaniques. La difficulté du protocole pour obtenir un bon étalement des cellules réduisait nettement le rendement de l'analyse des cellules. En effet, les HCT116 sont de petites cellules et un étalement parfait est nécessaire pour que les chromosomes puissent être individualisés les uns des autres (**Figure 38A**). La mise au point d'un protocole optimisé aurait nécessité davantage de temps.

4) Discussion

a) Les microdispositifs en PDMS sont adaptés à la croissance des sphéroïdes

Le PDMS présente une rigidité (~750 kPa) proche de celle des tissus. De ce fait, il peut reproduire la résistance réciproque qu'exercent les tissus environnants sur la croissance de la tumeur. Sa résistance a induit l'élongation des sphéroïdes et l'accumulation de stress solide au cours de leur croissance. De plus, la forme de la gouttière s'est révélée avantageuse car la direction des contraintes subies par les cellules était contrôlée et unidirectionnelle. Ceci représentait un avantage à l'analyse, comparativement aux travaux du groupe de R.K. Jain [60] dans lesquels les modifications du gel d'agarose induites par la croissance du sphéroïde sont à l'origine de contraintes mécaniques variables sur le pourtour du sphéroïde. Cependant, notre dispositif ne permet pas de mesurer et d'analyser les forces exercées par les sphéroïdes sur les bords des gouttières, et qui sont directement liées aux contraintes qu'ils subissent. Les méthodes qui ont été essayées pour résoudre ce point critique sont décrites ci-dessous.

b) La croissance des sphéroïdes entre les murs de PDMS contraint mécaniquement les sphéroïdes

Nous avons démontré la présence de forces de compression et de tension au sein des sphéroïdes contraints par des méthodes de relâchement de ces forces, soit par retrait d'entre les murs, soit par incision des sphéroïdes. Cependant, ces méthodes ne nous ont pas permis de déterminer ni l'amplitude ni la distribution des forces présentes au sein des sphéroïdes.

La technique de suivi de billes fluorescentes [40, 189] est difficilement applicable dans du PDMS car ce silicone, bien qu'il soit optiquement transparent, induit des aberrations optiques importantes qui rendraient difficile le suivi précis et exact de billes micrométriques. La fabrication de microdispositifs en agarose ou en phytigel permettrait d'adapter cette technique pour mesurer les forces de tractions qu'exercent les sphéroïdes sur les murs du dispositif, mais les contraintes exercées sur le sphéroïde seraient certainement moindres et pourraient induire un comportement multicellulaire différent. L'ajout de microgouttes lipidiques fluorescentes dans les sphéroïdes [192] pourrait permettre de déduire les forces qu'exercent les cellules localement au sein des sphéroïdes selon leur position dans le sphéroïde et selon l'état de compression de ce dernier. Mais cette technique nécessiterait également une imagerie fine dans un échantillon dense et compressé entre deux murs de PDMS.

Des mesures de rigidité des sphéroïdes contraints ont été envisagées par microscopie à force atomique. Le balayage de la surface des sphéroïdes contraints aurait pu permettre de révéler les différences de rigidité à la surface du sphéroïde entre les zones proches des murs et celle au centre. Cependant, le balayage d'une zone aussi grande reste difficile à réaliser avec les AFM, et l'accès aux zones les plus proches des murs est presque impossible avec le cantilever. La comparaison de ces mesures avec les sphéroïdes contrôles nécessite que des mesures soient prises sur ces sphéroïdes flottants, et qu'ils soient donc immobilisés pendant la mesure de force atomique, sans que leur rigidité n'en soit impactée. Cette difficulté technique a aussi mis un frein à des mesures de rigidité de surface par microscopie à force atomique.

En conclusion, nous nous sommes heurtés à la difficulté d'évaluer la modification des forces induites par la croissance entre les murs de PDMS, tout en sachant qu'il serait intéressant de disposer de cette information afin d'établir une corrélation entre la présence de contraintes, l'état de compression et de tension des cellules, et les comportements cellulaires observés.

c) La croissance sous contrainte mécanique modifie le gradient de prolifération

Les contraintes mécaniques résultant de la croissance des sphéroïdes dans un environnement confiné induisent la présence des cellules prolifératives sur l'ensemble des

sphéroïdes contraints, contrairement aux sphéroïdes contrôles. En effet, les cellules prolifératives sont présentes, bien qu'en quantité réduite, au centre des sphéroïdes contraints, alors qu'elles sont restreintes aux couches cellulaires les plus périphériques des sphéroïdes contrôles (**Figures 3B, 3C et S1B, S1C et S1F** de l'article). La contrainte mécanique induit donc une modification du gradient de prolifération au sein des sphéroïdes. Cette modification du gradient peut s'expliquer par la modification du gradient d'oxygène. En effet, le PDMS étant perméable aux gaz, les sphéroïdes contraints ne présentent pas de zones hypoxiques (**Figures 3D et S1D** de l'article). Le contrôle de la diffusion des nutriments est plus compliqué à effectuer. La diffusion de grosses protéines au sein des sphéroïdes pourrait être confirmée par la révélation de l'albumine par l'Evans Blue ou de l'ovalbumine couplée à un fluorophore, mais aucun des protocoles utilisés n'a fonctionné sur les sphéroïdes. Toutefois, la présence de cellules ayant incorporé de l'EdU localisées au centre des sphéroïdes contraints suggèrent que la quantité de nutriments au centre des sphéroïdes contraints est suffisante pour le passage du point R de restriction et l'entrée des cellules en phase G1 du cycle.

Dans les sphéroïdes contraints, il y a davantage de cellules en prolifération aux extrémités des sphéroïdes que dans les zones en contact avec les murs de PDMS (**Figure 3B-C** de l'article). Le groupe de R.K. Jain [60] avait montré que la prolifération se concentrait dans les régions de moindre stress, ce qui induisait une croissance orientée. De la même façon, la prolifération se fait dans les zones probablement moins comprimées des sphéroïdes contraints, et cette régionalisation serait responsable de la croissance allongée des sphéroïdes.

La modification du gradient de prolifération sous l'effet de la contrainte mécanique pourrait également être due à une modification de la durée du cycle cellulaire induite par la contrainte mécanique. Un allongement de la progression dans le cycle cellulaire pourrait expliquer que davantage de cellules soient encore marquées par le Ki67 alors qu'elles sont à une distance des bords du sphéroïde qui justifierait qu'elles ne prolifèrent plus. Un outil qui permettrait d'explorer cette question est la lignée HCT116 co-exprimant les rapporteurs Fucci (*Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*), qui sont deux biomarqueurs fluorescents permettant de repérer la position de la cellule dans le cycle cellulaire [193,

194]. Son utilisation permet de connaître la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de leur localisation dans le sphéroïde contraint, et d'identifier un potentiel allongement de la durée du cycle cellulaire.

En cultivant des sphéroïdes dans des gels d'agarose, l'équipe de R.K. Jain avait observé une augmentation du nombre de cellules apoptotiques [60]. Au contraire, il n'y a pas d'induction de l'apoptose dans les sphéroïdes contraints entre les deux murs de PDMS. Cette différence pourrait résulter d'un temps de culture des sphéroïdes différent, d'une réponse spécifique à la lignée cellulaire utilisée (lignée 67NR de carcinome mammaire murin non métastatique), ou des différences entre les dispositifs expérimentaux utilisés. Des travaux plus anciens de cette même équipe avaient quant à eux montré une diminution des pourcentages de cellules prolifératives et apoptotiques au sein de sphéroïdes cultivés dans des gels à 1% d'agarose [59]. Parallèlement, la densité cellulaire est augmentée. Ils font l'hypothèse que la densité cellulaire confère un avantage de survie aux cellules, inhibant ainsi les programmes de mort cellulaire. La croissance entre les murs de PDMS s'accompagne d'une augmentation de la densité cellulaire (**Figure 2A** de l'article), qui pourrait également conférer un avantage de survie aux cellules. Cependant, l'absence de mort cellulaire peut aussi s'expliquer par la modification des gradients d'oxygène et de nutriments dans les sphéroïdes contraints.

d) La contrainte mécanique empêche la progression en mitose

La méthode de détection des cellules proliférative par incorporation d'EdU au cours de la réplication de l'ADN permet de marquer toutes les cellules qui sont passées par la phase S de synthèse d'ADN pendant la durée d'incubation. Les cellules mitotiques qui ne sont pas révélées par le marquage EdU ont en fait passé la phase S depuis plus de 24h. De cette observation découle trois hypothèses :

- Ces cellules progressent très lentement dans le cycle,
- Ces cellules n'ont que très lentement progressé en G2 avant de finalement entrer en mitose,
- Ces cellules sont arrêtées en mitose.

Un défaut de progression des cellules en G2 laisserait sous entendre qu'il y a eu activation de point de contrôle G2/M, qui empêche les cellules ayant subi des dommages à l'ADN de passer en mitose.

De la même façon, l'arrêt des cellules en mitose peut provenir de l'activation du point de contrôle mitotique, le SAC. L'activation du SAC peut être révélée par immunofluorescence sur coupe par l'accumulation des protéines régulatrices du SAC au niveau des kinétochores des chromosomes. Le marquage des protéines activatrices du SAC est punctiforme. Il est donc difficile à repérer dans les cellules des sphéroïdes, qui sont des structures denses. Le SAC est activé dans toutes les cellules mitotiques jusqu'à ce qu'elles mettent en place la plaque métaphasique. Elles ne représentent qu'un faible pourcentage de la population cellulaire du sphéroïde à un temps donné. La vérification de l'état du point de contrôle mitotique dans les mitoses qui n'ont pas été révélées par l'EdU est donc compliqué. Le marquage par immunofluorescence sur coupes à congélation n'aboutit pas systématiquement. Aucun des 9 anticorps qui ont été essayés n'a révélé de marquages qui auraient pu correspondre à une activation du SAC.

Une alternative aurait été d'empêcher l'activation du point de contrôle mitotique dans les sphéroïdes par des méthodes de perte de fonction, et d'analyser si le taux de cellules mitotiques EdU-négatives chute dans les sphéroïdes contraints. La mise en œuvre de ces méthodes reste difficile sur les sphéroïdes. D'une part, au vu de la durée de culture des sphéroïdes, la transfection transitoire des cellules avant formation des sphéroïdes n'est pas compatible avec la conservation du transgène jusqu'à l'analyse. D'autre part, la transfection transitoire des cellules des sphéroïdes déjà formés risque d'être limitée par la pénétration peu profonde des transgènes.

Si l'hypothèse de l'arrêt des cellules en mitose induite par la contrainte mécanique est avérée, la proximité des cellules mitotiques EdU-négatives et de cellules mitotiques qui ont incorporées de l'EdU dans les sphéroïdes contraints est perturbante. Ce phénomène pourrait s'expliquer parce que les cellules mitotiques EdU positives sont également arrêtées en mitose, mais depuis moins de 24h. Cela laisse entendre qu'elles ont pu entrer en mitose alors même qu'elles étaient dans un environnement non propice à la progression normale en mitose. Une autre possibilité est que ces cellules ne soient pas arrêtées en mitose, et qu'elles progressent en mitose car elles ont une meilleure capacité d'adaptation à leur microenvironnement, alors même que certaines mitoses voisines se sont arrêtées car elles ne pouvaient plus s'adapter à leur environnement.

Cette hypothèse nous amène à proposer un modèle qui pourrait expliquer la présence de cellules arrêtées en mitose sous l'effet de la contrainte. A mesure de la division des cellules, le sphéroïde contraint croît, augmente sa compression et accumule du stress solide. Les cellules localisées dans le corps du sphéroïde entrent en mitose, et s'arrondissent en conséquence. Cependant, la croissance du sphéroïde induit une augmentation de contraintes au sein du sphéroïde, qui se répercute en partie sur la cellule mitotique. Celle-ci ne parvient plus à progresser en mitose, et s'arrête. Une autre mitose à ses côtés pourrait être capable d'entrer en mitose et parviendrait à la terminer si elle ne subissait pas d'excès de contraintes mécaniques. Cet arrêt en mitose sous l'effet d'une augmentation des contraintes pourrait également dépendre du stade de la mitose auquel la cellule perçoit les contraintes. Ce phénomène induit l'accumulation des cellules arrêtées en mitose au cours de la croissance allongée des sphéroïdes entre les murs de PDMS, jusqu'à ce que ces cellules mitotiques passent à un autre état.

PARTIE 2 :

ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANQUES SUR LE DEROULEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROIDES

Les résultats précédents révèlent que les contraintes mécaniques pourraient induire un arrêt ou un délai de la progression des cellules en mitose. Ce délai pourrait être dû à un défaut de mise en place du fuseau mitotique dans les cellules mitotiques, qui n'est pas associé à un défaut d'arrondissement des cellules au moment de la division. Dans cette deuxième partie des résultats, nous nous intéressons à **l'impact des contraintes mécaniques sur la dynamique de progression** des cellules en mitose au sein des sphéroïdes. Afin d'analyser la dynamique de progression en mitose des cellules des sphéroïdes, nous avons utilisé le SPIM (*Single Plane Illumination Microscopy*), qui est particulièrement adapté à l'imagerie dynamique et en 3D des sphéroïdes, comme présenté en introduction générale.

1) Analyse de la dynamique de progression en mitose dans les sphéroïdes contrôles

a) Détermination des différentes étapes de la mitose, en 3D et en temps réel, au sein des sphéroïdes

Afin de pouvoir suivre les divisions cellulaires au sein des sphéroïdes, des acquisitions de sphéroïdes constitués de cellules HCT116 exprimant l'histone H2B fusionnée à la mCherry (HCT116-H2B-mCherry) ont été réalisées. Cette lignée cellulaire permet de détecter tous les noyaux au sein du sphéroïde et de suivre la dynamique des événements chromosomiques qui ont lieu pendant la mitose. Les conditions d'imagerie en SPIM utilisées sont détaillées dans la section Matériel et Méthodes [181]. Pour chaque sphéroïde étudié, un stack de 150µm est réalisé toutes les 4 minutes sur une durée inférieure à 4h (**Film3**). Cette résolution permet de suivre, grâce au logiciel de représentation 3D Imaris, la dynamique des événements chromosomiques qui ont lieu pendant la mitose (**Figure 39A-B, Film4**). Le début de la condensation de la chromatine est repérable à l'aspect granuleux des noyaux. La condensation et l'organisation des chromosomes peuvent être suivies jusqu'à l'établissement de la plaque métaphasique, identifiée par l'organisation des chromosomes en un cylindre très aplati axialement, plein et homogène sans mouvement apparent de

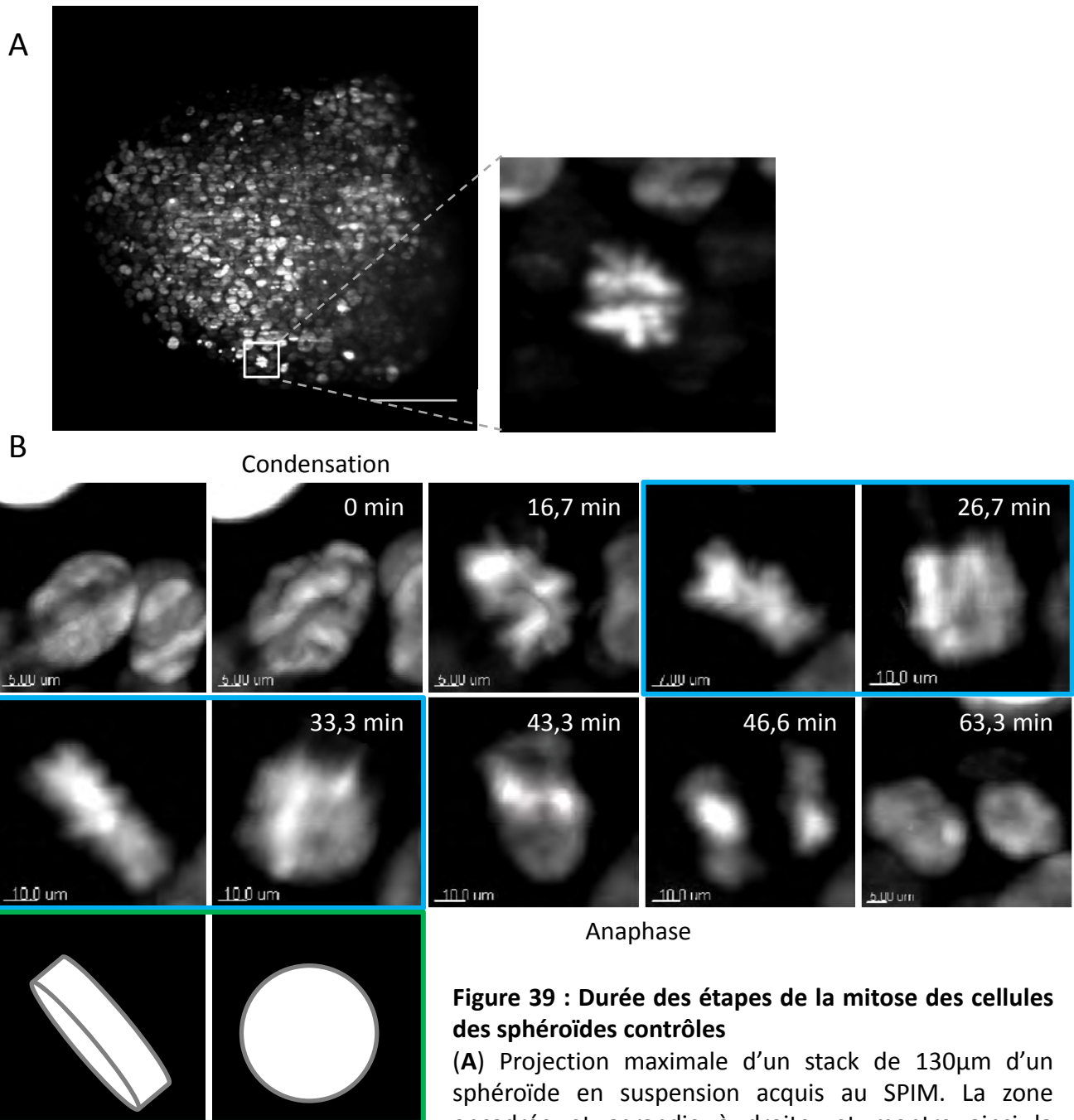
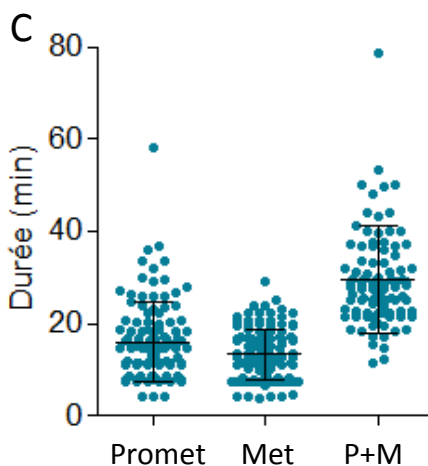


Figure 39 : Durée des étapes de la mitose des cellules des sphéroïdes contrôles

(A) Projection maximale d'un stack de 130 μ m d'un sphéroïde en suspension acquis au SPIM. La zone encadrée et agrandie à droite, et montre ainsi la résolution suffisante à la détection de cellules mitotiques dans un échantillon aussi grand et dense. Barre d'échelle : 100 μ m.

(B) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde contrôle, en représentation 3D, d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). La plaque métaphasique, fine et homogène, est établie à 33,3 minutes, et l'anaphase se déroule à 46,6 minutes. Les images encadrées en bleue correspondent à la cellule au même temps, mais selon un angle de vue différent. Les schémas encadrés en vert représentent la plaque métaphasique sous forme d'un cylindre blanc aplati fin et homogène, selon les deux angles de vue correspondant aux images du dessus.



chromosomes individuels. Le début de la métaphase est défini au temps auquel l'ellipsoïde formé par l'ensemble des chromosomes est le plus aplati. A l'anaphase, la séparation des deux lots de chromosomes est très nettement visible.

Le repérage de ces différents événements lors du suivi en temps réel de la progression en mitose permet de mesurer facilement la durée de la prométaphase (comprise entre le début de la condensation et le premier temps où la plaque métaphasique est établie) et la durée de la métaphase (comprise entre le premier temps où la plaque métaphasique est établie, et l'anaphase). Un pas de temps de 4 minutes entre chaque acquisition a été utilisé. Les sphéroïdes étudiés dans ces expériences sont équivalents aux sphéroïdes contrôles des expériences de croissance entre les murs de PDMS, c'est-à-dire qu'ils mesurent environ 700µm de diamètre.

b) Analyse de la durée des phases de la mitose dans les sphéroïdes contrôles

Des données de l'équipe montrent que la durée moyenne des mitoses dans les sphéroïdes de cellules HCT116, depuis la condensation jusqu'à la cytokinèse et décondensation de la chromatides des cellules filles, est de l'ordre de 90 minutes.

Les résultats des mesures des durées de prométaphase et de métaphase dans les sphéroïdes en conditions contrôle révèlent que la durée moyenne de chaque étape est de 16 (+/- 9) et 13 (+/- 5) minutes respectivement (**Figure 39C**). 7,5% des mitoses ont une durée de prométaphase supérieure à 30 minutes, moins de 2% des mitoses ont une durée de métaphase qui excède 30 minutes, au total moins de 5,3% des mitoses ont une durée de prométaphase et de métaphase cumulée supérieure à 60 minutes (n>100 mitoses). Ces mesures confirment la possibilité de suivre et de quantifier la progression des cellules en mitose en temps réel au niveau des couches périphériques des sphéroïdes. Elles permettent d'avoir une première caractérisation de la dynamique de progression des cellules en mitose. De plus, elles montrent que les durées de la prométaphase et de la métaphase sont assez homogènes sur l'ensemble des mitoses.

Figure 39 (suite de la légende) :

(C) Graphe représentant la durée (+/- déviation standard), en minutes, de la prométaphase (Promet), de la métaphase (Met) et de la prométaphase et métaphase cummulées (P+M), pour des mitoses de sphéroïdes contrôles. Chaque point correspond à une mitose.

2) Analyse de la dynamique de progression en mitose dans les sphéroïdes contraints

a) Caractérisation des sphéroïdes placés sous contrainte isotrope en agarose

La stratégie d'analyse décrite ci-dessus n'est pas applicable au modèle de sphéroïde en croissance entre les murs de PDMS. Des données de l'équipe montrent en effet que le PDMS induit d'importantes aberrations optiques (R. Jorand, données non publiées). Le saut d'indice entre le milieu et le PDMS est aussi important que celui existant entre l'eau et le verre, et dévie largement la feuille de lumière lorsqu'elle attaque le PDMS, mais dévie également le trajet des photons émis. Ces contraintes optiques ne permettaient donc pas de réaliser l'imagerie de sphéroïdes contraints en faisant passer les trajets optiques à travers le PDMS. De surcroît, il était très difficile de contrôler précisément l'orientation du dispositif de PDMS contenant le sphéroïde contraint de façon à ce que les trajets optiques d'illumination et de détection ne traversent pas le PDMS.

Afin de pouvoir accéder à la dynamique de progression en mitose au sein des sphéroïdes, nous avons opté pour une contrainte induite par la croissance dans de l'agarose. Le groupe de R.K. Jain [59] a été le premier à tenter de quantifier l'accumulation de stress mécanique induit par la croissance de sphéroïdes enrobés dans de l'agarose. Ils montrent que l'agarose, dès une concentration de 0,3%, réduit la croissance des sphéroïdes (**Figure 34B**). A partir de 0,7% d'agarose, la croissance des sphéroïdes cause l'accumulation de stress dans le gel directement adjacent au sphéroïde. Par contre, au-delà de 1% d'agarose, la rigidité de l'agarose est telle qu'elle induit l'inhibition totale de la croissance des sphéroïdes. Il montre également que la croissance des sphéroïdes peut induire des fractures dans le gel [60]. Ceci modifie la distribution des contraintes mécaniques, et le sphéroïde s'adapte en prenant une forme allongée qui lui permet de croître dans les zones de moindre stress (**Figure 10A et 33**). Par ailleurs, les données de l'équipe ont montré que l'agarose induit peu d'aberrations optiques avec un indice de réfraction proche de celui de l'eau [195]. La croissance en agarose est expérimentalement réalisable dans les cuves en phytagel utilisées pour l'imagerie en temps réel des sphéroïdes [181].

En nous appuyant sur ces données, nous avons enrobé les sphéroïdes avec de l'agarose Low Melting Point à 1%. A cette concentration, la croissance des sphéroïdes s'accompagne d'un

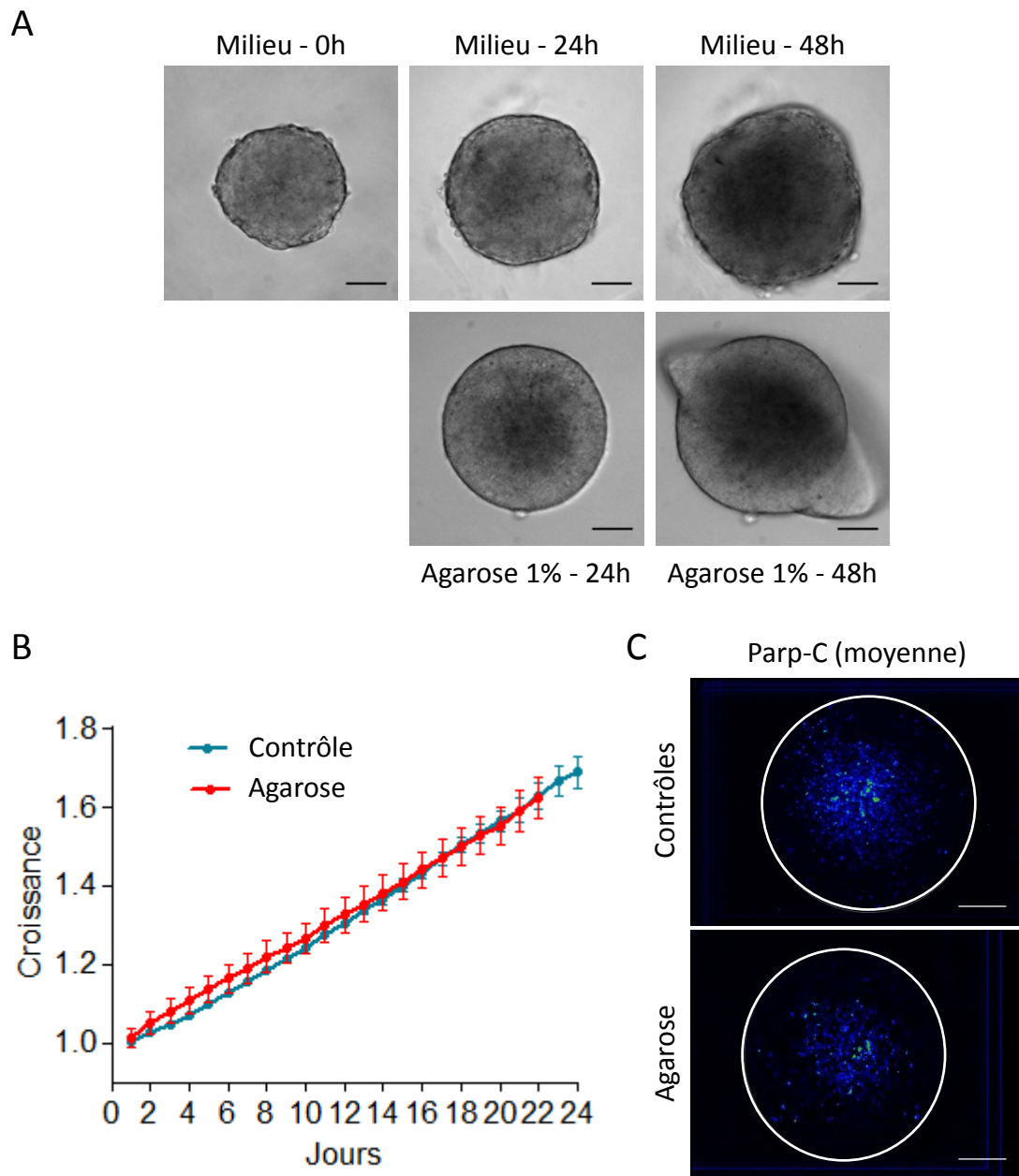


Figure 40 : Caractéristiques de la croissance des sphéroïdes dans un gel d'agarose

(A) Images en lumière transmise de sphéroïdes libres en suspension dans du milieu (haut) ou contraint dans de l'agarose de concentration 1% depuis 24 et 48h. Au temps 0, les sphéroïdes font 300 μ m de diamètre. On remarque que le sphéroïde rompt le gel de 1% dès 48h. Barre d'échelle : 100 μ m

(B) Graphe représentant les courbes de croissance (+/- écart-type) de sphéroïdes libres dans du milieu (Contrôle) ou contraint dans de l'agarose 1% (Agarose). Au début des mesures, les sphéroïdes font 300 μ m de diamètre. La croissance est mesurée à partir de l'aire des sphéroïdes détectée sur des images en lumière transmise semblables à celles de (C).

(C) Images représentant la moyenne d'intensité de fluorescence du marquage des cellules apoptotiques (Parp-C) de plusieurs coupes de sphéroïdes contrôles (haut) et de sphéroïdes contraints (bas). On note qu'il n'y a pas d'avantage d'induction de mort cellulaire par la contrainte mécanique qu'en condition contrôle. Les cercles blancs représentent les pourtours des sphéroïdes. Barre d'échelle : 200 μ m.

arrondissement presque parfait des sphéroïdes visible dès 24h, et d'une rupture et d'un envahissement du gel par les cellules à partir de 30 heures de culture (**Figure 40A**). Ces phénomènes prouvent l'existence d'une contrainte mécanique associée à la croissance des sphéroïdes dans le gel d'agarose. Nous avons décidé d'étudier la progression des cellules en mitoses après 24h de croissance des sphéroïdes dans l'agarose 1%. Cette contrainte mécanique n'affecte pas la croissance des sphéroïdes, comme le montrent les analyses réalisées sur des sphéroïdes de 300µm de diamètre (**Figure 40B**). Nous avons mesuré l'évolution de l'aire des sphéroïdes (**Figure 40B**) des conditions contrôles (n=31) et des conditions contraintes (n=23). Les résultats montrent qu'il n'y a pas d'inhibition de la croissance des sphéroïdes lors des 24 premières heures de culture dans de l'agarose 1%.

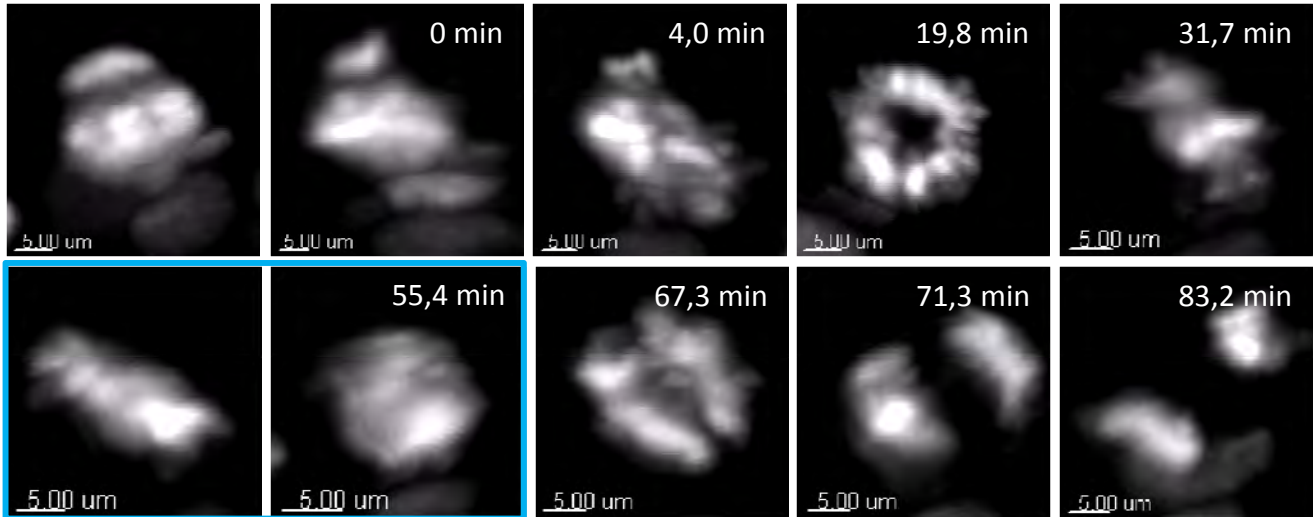
Afin de vérifier l'effet de la croissance en agarose sur l'induction de la mort cellulaire, nous avons réalisé des marquages des cellules apoptotiques (Parp-clivée) sur coupes à congélation de sphéroïdes contrôles et de sphéroïdes contraints pendant 24h (**Figure 40C**). La moyenne de l'intensité de marquage de plusieurs coupes montre qu'il n'y a pas d'induction de mort cellulaire dans les sphéroïdes contraints par rapport aux sphéroïdes contrôles.

Ces résultats nous ont confortés dans le choix de concentration d'agarose à 1% pour analyser l'impact d'une contrainte mécanique sur la dynamique de progression en mitose au sein des sphéroïdes.

b) Analyse de la durée des phases de la mitose dans les sphéroïdes contraints

La dynamique de progression en mitose des cellules des sphéroïdes contraints en agarose depuis 24h a été analysée comme décrit précédemment (**Figure 41A, Film 5 et 6**). L'analyse des durées des étapes de prométaphase et de métaphase des mitoses des sphéroïdes contraints en agarose (n>40) révèle une différence notable de la durée de la prométaphase avec ceux des sphéroïdes contrôles (**Figure 41B**). En effet, la durée de la prométaphase est en moyenne augmentée d'une dizaine de minutes (27 +/- 15 minutes, contre 16 +/- 9 minutes en condition contrôle), mais les résultats obtenus montrent surtout une dispersion plus importante des valeurs en condition contrainte. Ainsi, une sous-population de cellules en mitose présente des durées de prométaphase comprises entre 45 et 60 minutes, alors

A



B

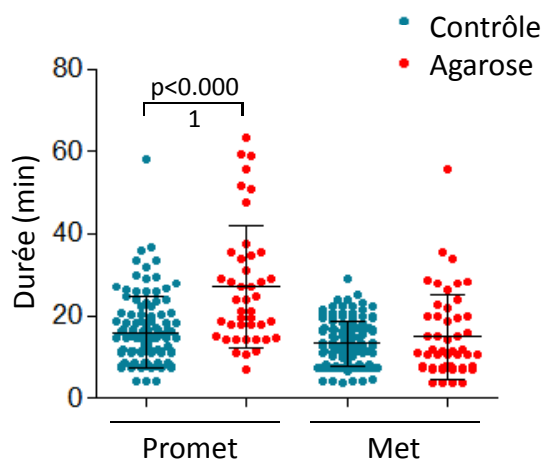


Figure 41 : Durée des étapes de la mitose de cellules de sphéroïdes contraints dans de l'agarose

(A) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde contraint dans l'agarose depuis 24h, en représentation 3D d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). Une rosace est très nettement visible à 19,8 minutes. La plaque métaphasique est établie à 55,4 minutes, et l'anaphase se déroule à 67,3 minutes. Les images encadrées en bleue correspondent à la cellule au même temps (55,4 min), mais selon un angle de vue différent.

(B) Graphe représentant la durée (+/- déviation standard), en minutes, de la prometaphase (Promet), de la métaphase (Met) pour des mitoses de sphéroïdes contrôles (bleu) et de sphéroïdes contraints en agarose 1% depuis 24h (rouge). Chaque point correspond à une mitose.

que cette population est inexistante en condition contrôle. Une organisation des chromosomes en rosace est également nettement visible au cours de cette phase de la mitose dans les sphéroïdes contraints en agarose.

A l'inverse, la contrainte mécanique semble avoir peu d'impact sur la durée de la métaphase. Celle-ci voit sa moyenne maintenue proche de celle de la condition contrôle et sa dispersion augmente peu (15 +/- 10 minutes contre 13 +/- 6 minutes en condition contrôle).

Ces résultats montrent que la contrainte mécanique induit un délai de progression en prométaphase, et n'a qu'un impact mineur sur la progression en métaphase des mitoses dans les sphéroïdes.

3) Discussion

a) Une organisation des chromosomes en rosace est visible dans les cellules mitotiques des sphéroïdes contraints

Lors de l'analyse de la progression des cellules mitotiques dans les sphéroïdes contraints, la conformation *en rosace*, prise par les chromosomes de façon récurrente pendant la prométaphase, est nettement observable. Cette conformation consiste en un disque proche de celui obtenu à la métaphase mais qui est vide de chromosomes en son centre, dont le contour est irrégulier et l'épaisseur supérieure à celle des plaques métaphasiques (**Figure 21 et 41A**). Cette conformation en rosace est le plus souvent associée à un allongement de la durée de la prométaphase dans les sphéroïdes contraints (**Film 6**). Cette conformation propre à la prométaphase, est connue de longue date [196] et a été décrite au cours de la prométaphase sans altération de la mitose. Elle dure en moyenne 5 minutes.

Il se trouve qu'elle est effectivement visible épisodiquement dans les sphéroïdes contrôles. Ayant un pas de temps de 4 minutes entre chaque acquisition, ceci explique qu'elle n'est que transitoirement aperçue au cours des mitoses dans les sphéroïdes contrôles. Le fait que cette organisation soit plus systématiquement visible dans les sphéroïdes contraints est associé à l'allongement de la prométaphase dans cette condition. Ainsi, sa persistance dans les sphéroïdes contraints suggère un défaut de capture des kinétochores des chromosomes

par les microtubules pour former la plaque métaphasique. Un défaut de mise en place du fuseau bipolaire pourrait donc expliquer ces observations.

b) La contrainte mécanique induit un délai de progression en prométaphase

Le délai de progression en prométaphase mis en évidence semblerait donc provenir d'un défaut de mise en place du fuseau. Ce délai en prométaphase laisse penser que le point de contrôle mitotique a été activé. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'activation du SAC à cause de problèmes techniques. Cependant, la plupart des cellules analysées parviennent à établir une plaque métaphasique et à progresser en anaphase, suggérant que les défauts du fuseau existant aient pu être corrigés ou compensés. Il existe de nombreuses raisons qui peuvent expliquer un défaut de mise en place du fuseau bipolaire. Certaines des causes entraînant ce défaut de mise en place du fuseau et qui pourrait être corrigées par un délai en prométaphase sont présentées dans les paragraphes suivants.

i. Défaut de duplication des centrosomes

Le défaut de mise en place du fuseau bipolaire pourrait s'expliquer par un défaut de duplication des centrosomes.

Le contrôle du cycle de duplication des centrosomes implique de nombreux acteurs moléculaires. Il est partiellement régulé de la même façon que le cycle cellulaire. Par exemple, la déplétion des complexes Cdk2-CyclineE bloque la duplication des centrosomes [197].

L'absence de démonstration de liens entre l'environnement mécanique et la duplication des centrosomes pour le bon déroulement de la mitose n'exclut pas l'hypothèse que le délai en prométaphase observé dans les sphéroïdes contraints résulte d'une décoordination entre la duplication des centrosomes et le cycle cellulaire. Il est envisageable que la séparation des centrioles parentaux pour permettre la mise en place du fuseau bipolaire soit par exemple retardée par la contrainte mécanique.

ii. Défauts de dynamique des microtubules

L'établissement d'un fuseau métaphasique nécessite que la cellule mitotique ait contrôlé tous ses éléments biochimiques et biomécaniques pour parvenir à un état d'équilibre. Cet état d'équilibre est apparent, car il résulte d'un contrôle précis de toutes les dynamiques

pour qu'elles s'équilibrent les unes les autres [198]. Le fait qu'un seul kinétochore non correctement attaché aux microtubules empêche la transition vers l'anaphase [199] prouve bien qu'un léger déséquilibre des forces empêche la progression de la mitose par des signaux biochimiques (tel que le changement de conformation de Mad2) [120]. Il est donc possible que la contrainte mécanique modifie l'état biomécanique des cellules et entraîne un déséquilibre qui met plus de temps à être corrigé.

Puisque nous observons une conformation des chromosomes en rosace, c'est que la force d'éjection polaire existe dans les cellules des sphéroïdes sous contrainte. Il est probable que l'attachement des microtubules aux kinétochores soit perturbé par la contrainte et ralentisse la transition vers la plaque métaphasique.

Des protéines motrices accrochées aux chromosomes, les chromokinésines, participent à la régulation de la dynamique des microtubules pour l'établissement de la plaque métaphasique [200]. Les effets antagonistes des chromokinésines Kid et Kif4A permettent de moduler les mouvements de centrosomes pour mieux les aligner sur la plaque métaphasique. Elles participent à la régulation de la dynamique des microtubules, mais peuvent cibler des populations de microtubules distinctes. Par exemple, Kif18A supprime la polymérisation des microtubules kinétochoriaux, tandis que Kif4A supprime celle des microtubules non kinétochoriaux. Ces régulations apparemment opposées contribuent à limiter les mouvements des centromères. Ce résultat n'est qu'un exemple parmi l'ensemble des chromokinésines qui participent à la régulation de la dynamique des microtubules, prouvant que cette régulation est complexe.

Le groupe de B. Baum [131] montre que le défaut de mise en place du fuseau dans des cellules confinées peut être corrigé par un allongement des microtubules. Dans leur expérience, l'allongement est permis par la déplétion d'une kinésine de désassemblage des microtubules associés aux centrosomes, MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*), mais l'on peut imaginer que, selon le contexte cellulaire, l'adaptation des dynamiques des microtubules peut provenir de la cellule elle-même. Cet exemple illustre l'adaptation possible de la dynamique des microtubules à l'état cellulaire pour la progression en mitose.

La stabilité de l'attachement des microtubules aux kinétochores est aussi très importante car les chromosomes pourront alors être alignés correctement sur la plaque métaphasique par

les microtubules, avant l'anaphase. Deux exemples illustrent clairement l'implication d'un défaut d'attachement stable de microtubules aux kinétochores dans un délai en prométaphase. Le premier démontre que la déplétion en Nuf2, une protéine du complexe Ndc80 nécessaire à l'attachement stable des microtubules aux kinétochores [201], perdure plus longtemps la conformation des chromosomes en rosace [116]. Le deuxième concerne la protéine Spindly chez la Drosophile, qui régule la localisation de la dynéine au niveau des kinétochores [202]. Son inhibition réduit la tension aux kinétochores et empêche la stabilisation des microtubules kinétochoriaux. Il en résulte un délai en prométaphase et un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. Un défaut d'attachement correct des microtubules aux kinétochores pourrait très bien expliquer le délai en prométaphase associé à une configuration des chromosomes en rosace dans les sphéroïdes sous contrainte mécanique. L'attachement stable prendrait plus de temps mais serait finalement établi par la suite, peut-être grâce à des mécanismes redondants d'attachement des microtubules aux kinétochores.

De la même façon que dans les sphéroïdes contraints entre les murs de PDMS, le délai en prométaphase pourrait s'apparenter à un défaut de bipolarité. Celui-ci pourrait s'expliquer par un défaut de séparation des centrosomes. Les forces générées par le mouvement des microtubules participent à la séparation des centrosomes [203]. Lorsque les centrosomes ne sont pas correctement séparés, le fuseau a plus de difficultés à s'organiser, il peut en résulter un délai en mitose. La régulation des forces nécessaires à la séparation des centrosomes fait intervenir de nombreuses protéines : la Dynéine [204], Eg5 [205] la chromokinésine KLP3A [206], Nuf2 [207], etc.

La régulation des forces par la dynamique des microtubules est certainement encore plus complexe que ce que nous en savons à l'heure actuelle. C'est l'intégration de toutes ces petites unités créatrices et gestionnaires des forces qui permet l'établissement du fuseau mitotique à l'équilibre. Il est donc envisageable que les contraintes mécaniques induisent un défaut dans la création des forces internes par les protéines motrices ou par les protéines régulatrices des microtubules, et soient ainsi responsables de l'allongement en prométaphase observé, jusqu'à ce qu'une adaptation efficace se mette en place pour l'établissement du fuseau mitotique. Puisqu'il existe des mécanismes redondants pour le

déroulement correct de la mitose, l'analyse et la compréhension des interactions entre les différents éléments résultant en un allongement de la prométaphase sous contrainte mécanique s'avèrent particulièrement compliquées, surtout si l'on considère les lacunes scientifiques concernant la dynamique du fuseau mitotique dans sa globalité [198].

iii. Défaut de dynamique du cytosquelette d'actomyosine

L'établissement, la régulation et la fonction du fuseau mitotique ont longtemps été considérés comme dépendant exclusivement du cytosquelette des microtubules. Cependant, de plus en plus d'études démontrent la participation évidente du cytosquelette d'actomyosine dans le contrôle du fuseau mitotique [208].

Tout d'abord, l'actine corticale permet l'arrondissement des cellules mitotiques, dont le but peut-être d'élargir l'espace cellulaire pour le bon déroulement de chacune des étapes de la mitose. Le groupe de B. Baum [131] propose qu'une grande partie des défauts de formation du fuseau mitotique soient associés à un défaut d'arrondissement des cellules mitotiques. Ils montrent que, lorsque les cellules sont mécaniquement confinées, le défaut d'arrondissement entraîne un défaut d'organisation des chromosomes en rosace, un défaut de capture des kinétochores par les microtubules, un allongement de la durée des mitoses. Afin de vérifier si un défaut d'arrondissement peut expliquer le phénotype observé dans les sphéroïdes contraints, l'aire et la circularité des cellules mitotiques ont été comparées entre les sphéroïdes contrôles et les sphéroïdes contraints (**Figure S1**). De la même façon que pour les cellules mitotiques des sphéroïdes confinés entre les deux murs de PDMS, il n'y a pas de défaut d'arrondissement des cellules mitotiques dans les sphéroïdes contraints dans l'agarose. Ainsi, leur modèle de confinement de cellules uniques ne semble pas reproduire ce qui existe dans des microtumeurs. Dans notre modèle, l'arrondissement des cellules mitotiques est peut-être permis par une adaptation du tissu entier à la contrainte mécanique environnante, et n'est probablement pas impliqué dans le défaut de mise en place du fuseau mitotique.

Il est maintenant établi que le cytosquelette d'actomyosine participe, en coordination avec les microtubules, à la séparation et au positionnement des centrosomes après la dislocation de l'enveloppe nucléaire. Le groupe de B. Baum [209] démontre que l'inhibition de la

contractilité du cytosquelette d'actomyosine empêche la séparation complète des centrosomes après la dislocation de l'enveloppe nucléaire. Le fuseau mitotique se forme anormalement entre les centrosomes regroupés dans un coin de la cellule. Il semblerait que ce soit la coordination entre la contraction et l'expansion du cortex par la myosine II qui entraîne les centrosomes jusqu'à leur localisation terminale, par le biais des microtubules astraux. Cao *et al.* [210], quant à eux, montrent que la séparation précoce des centrosomes dans l'embryon de *Drosophile* nécessite un réarrangement dynamique de l'actine en l'interphase. Cependant, un défaut de séparation des centrosomes par l'inhibition de l'actine est ensuite compensé par un autre mécanisme plus tardif.

Les deux études s'accordent à montrer que le cytosquelette d'actomyosine est impliquée dans la séparation des centrosomes. Dans notre cas, la contrainte mécanique pourrait induire un défaut de cytosquelette d'actomyosine qui ralentirait le positionnement des centrosomes, et ainsi l'établissement du fuseau mitotique.

Bien qu'il y ait peu d'arguments pour cette hypothèse, un défaut de dynamique de l'actine pourrait aussi être impliqué dans le délai en prométaphase. Il a déjà été décrit que l'augmentation de polymérisation des filaments d'actine entraîne une localisation anormale de l'actine autour des chromosomes condensés et un délai de transition de la métaphase à l'anaphase dans les cellules hématopoïétiques [211]. La mauvaise localisation de l'actine pourrait être une barrière physique pour la capture et la séparation des chromosomes, ce qui expliquerait le délai en mitose observé dans les cellules de cette étude. Cette hypothèse n'est donc pas exclue pour l'explication du phénotype observé dans les cellules des sphéroïdes sous contraintes.

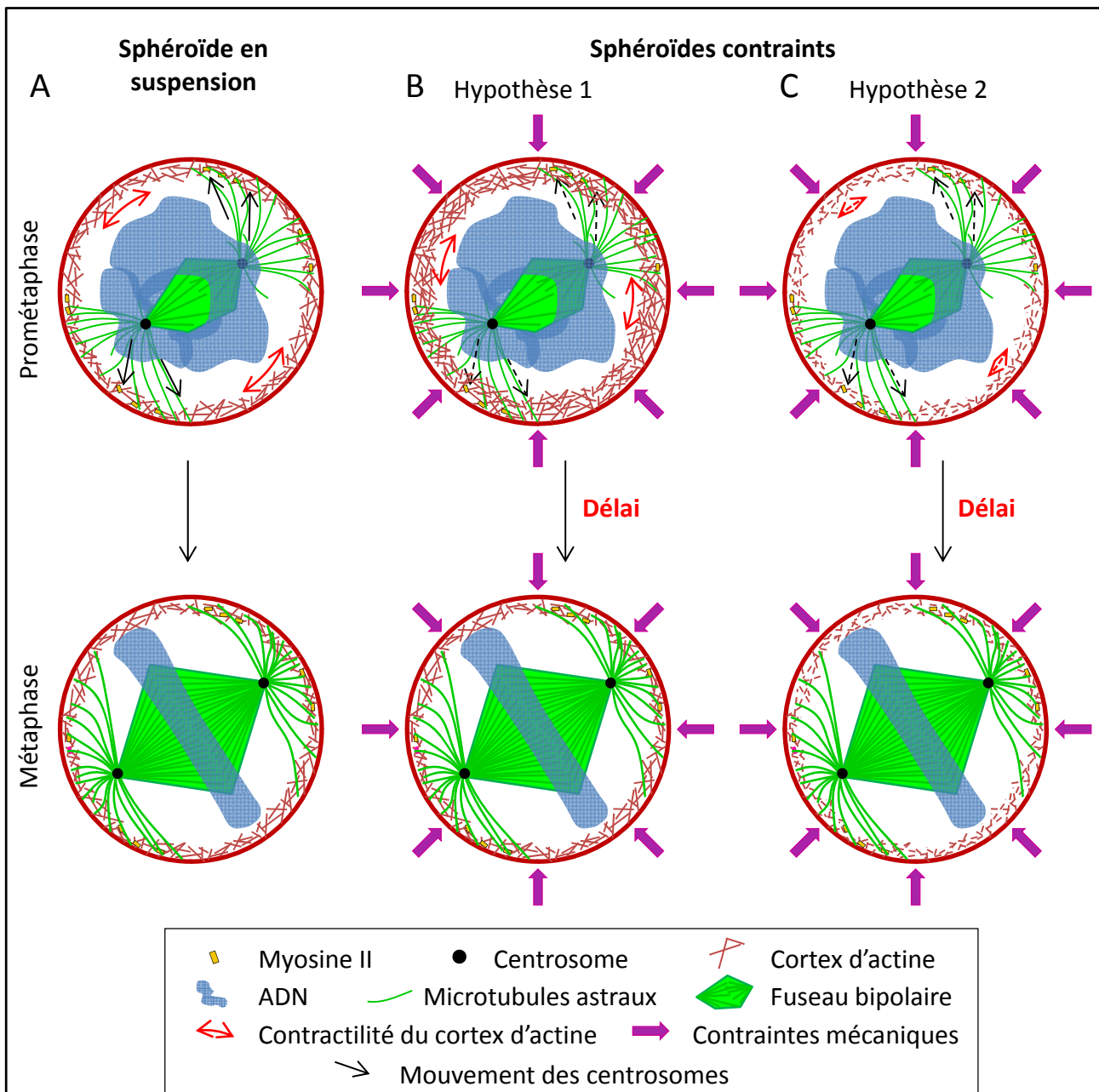


Figure 42 : Modèle cellulaire du déroulement de la mitose dans les cellules des sphéroïdes

(A) Dans un sphéroïde en suspension, le cortex d'actine participe à la mise en place du fuseau mitotique grâce à ses mouvements contractiles qui entraînent les microtubules astraux accrochés au cortex. Ces mouvements participent à l'éloignement et au positionnement des centrosomes, et permettent aux microtubules kinétochoriaux d'attraper les chromosomes pour les aligner sur la plaque métaphasique.

(B) Selon l'hypothèse 1, les contraintes mécaniques pourraient induire une organisation différente du cortex d'actine comparativement aux cellules mitotiques des sphéroïdes en suspension, par exemple avec une accumulation plus importante d'actine sous la membrane plasmique. Davantage de temps serait alors nécessaire à la réorganisation d'un cortex d'actine efficace pour l'établissement du fuseau mitotique.

(C) Selon l'hypothèse 2, les contraintes mécaniques pourraient déstabiliser le cytosquelette d'actomyosine. Ainsi, ce dernier devient inefficace, et un autre mécanisme devrait prendre le relai pour permettre l'établissement du fuseau mitotique.

PARTIE 3 :

ETUDE DE L'IMPLICATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTOMYOSINE DANS LE DEROULEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROÏDES

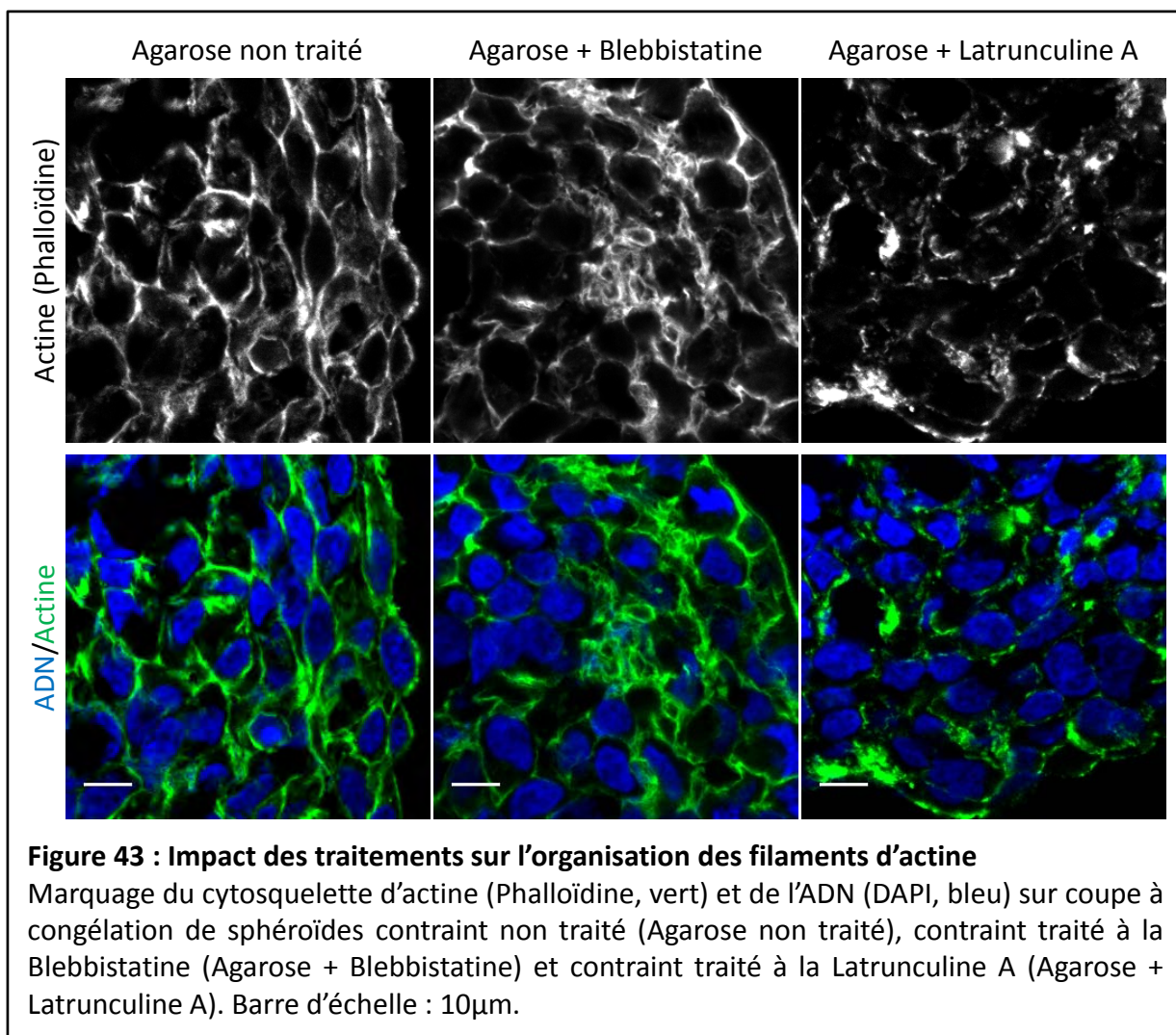
Le cytosquelette d'actomyosine participe activement à l'établissement du fuseau mitotique, en arrondissant les cellules [89], en séparant les centrosomes [209] et en orientant le fuseau mitotique [139], tout en prenant en compte de façon continue le contexte mécanique des cellules en division. Pour la suite de l'étude, nous nous sommes appuyés, sur un modèle cellulaire qui regroupe ces rôles du cytosquelette d'actomyosine (**Figure 42**). Dans les sphéroïdes sous contrainte mécanique, le cytosquelette d'actomyosine perçoit l'environnement contraint, ajuste son organisation et participe à la mécanotransduction intracellulaire. Il est envisageable que le délai en prométaphase induit par la contrainte soit la conséquence d'une modification de l'organisation du cytosquelette d'actomyosine en réponse à la contrainte mécanique (deux hypothèses sont détaillées dans la **Figure 42B-C**). Cette partie porte sur **l'implication du cytosquelette d'actomyosine dans la progression des cellules en mitose** au sein des sphéroïdes contrôles et contraints.

1) Analyse de l'impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur l'organisation de l'actine au sein des sphéroïdes

Nous avons souhaité agir à deux niveaux pour inhiber le cytosquelette d'actomyosine : d'une part, en inhibant la contractilité des filaments d'actine, d'autre part en inhibant l'assemblage et donc la dynamique des filaments d'actine.

a) Inhibition de la contractilité des filaments d'actine par la Blebbistatine

La Blebbistatine est un inhibiteur de l'activité ATPase de la myosine II [212]. La myosine II ne peut plus utiliser l'énergie de l'ATP pour changer de conformation. La Blebbistatine induit la rupture du réseau établi avec l'actine, mais également entre l'actine et les sites d'adhésion. Il en résulte un système contractile déstabilisé [213].



Des données de l'équipe ne montrent pas d'effet net de la Blebbistatine sur l'organisation du cytosquelette d'actine de cellules HCT116 cultivées en 2D après 2h de traitement, et ce jusqu'à la concentration de 50 μ M. Pourtant, la Blebbistatine a un effet sur la formation des sphéroïdes dès 5h de traitement à 5 μ M. Afin d'être certains d'inhiber en grande partie la myosine II, nous avons choisi de traiter les sphéroïdes avec 20 μ M de Blebbistatine pendant 24h.

Bien que la diffusion de molécules 200 fois plus grosses que la Blebbistatine (comme l'Albumine) à travers l'agarose ait déjà été démontrée [214], la diffusion de la drogue à travers l'agarose et le phytigel, qui constitue les parois des cuves utilisée pour l'imagerie en temps réel, a été vérifiée. La diffusion de la Blebbistatine a été analysée en comparant les concentrations par mesure d'absorbance à l'extérieur et à l'intérieur de cuves d'agarose et de phytigel. Les résultats présentés en annexe (**Figure S2**) montrent de faibles différences de concentration après diffusion. Dans les conditions expérimentales utilisées pour l'analyse de sphéroïdes en SPIM, les épaisseurs d'agarose et de phytigel étant beaucoup plus faibles, ces résultats indiquent que l'effet des gels sur la diffusion des drogues semble négligeable.

Sur coupes à congélation de sphéroïdes contraints traités à la Blebbistatine, dont les filaments d'actine ont été révélés par la Phalloïdine, on remarque qu'il existe toujours un réseau d'actine, bien qu'il soit différent de celui des sphéroïdes contraints non traités (**Figure 43**). Les cellules possèdent un réseau d'actine cortical relativement fin et homogène. Mais dans d'autres zones du sphéroïde, on observe une accumulation de filaments d'actine qui semblent organisés de façon multidirectionnelle. Ces zones correspondent peut-être à des protrusions membranaires qui n'ont pas été rétractées après blebbing. Les blebs sont des protrusions de la membrane plasmique découplées du cortex d'actine. Le détachement de la membrane plasmique du cortex d'actine permet au cytosol de s'infiltrer dans cette protrusion qui grossit en conséquence. Au-delà d'une certaine taille, le cortex d'actine se reforme à l'intérieur du bleb. Ensuite, la myosine II est recrutée pour guider la rétraction du bleb jusqu'à sa disparition. Ce phénomène est aussi inhibé par la Blebbistatine [215]. Ses observations suggèrent qu'après 24h de traitement à la Blebbistatine, l'actine corticale est toujours présente sans différence d'intensité évidente sur les images analysées.

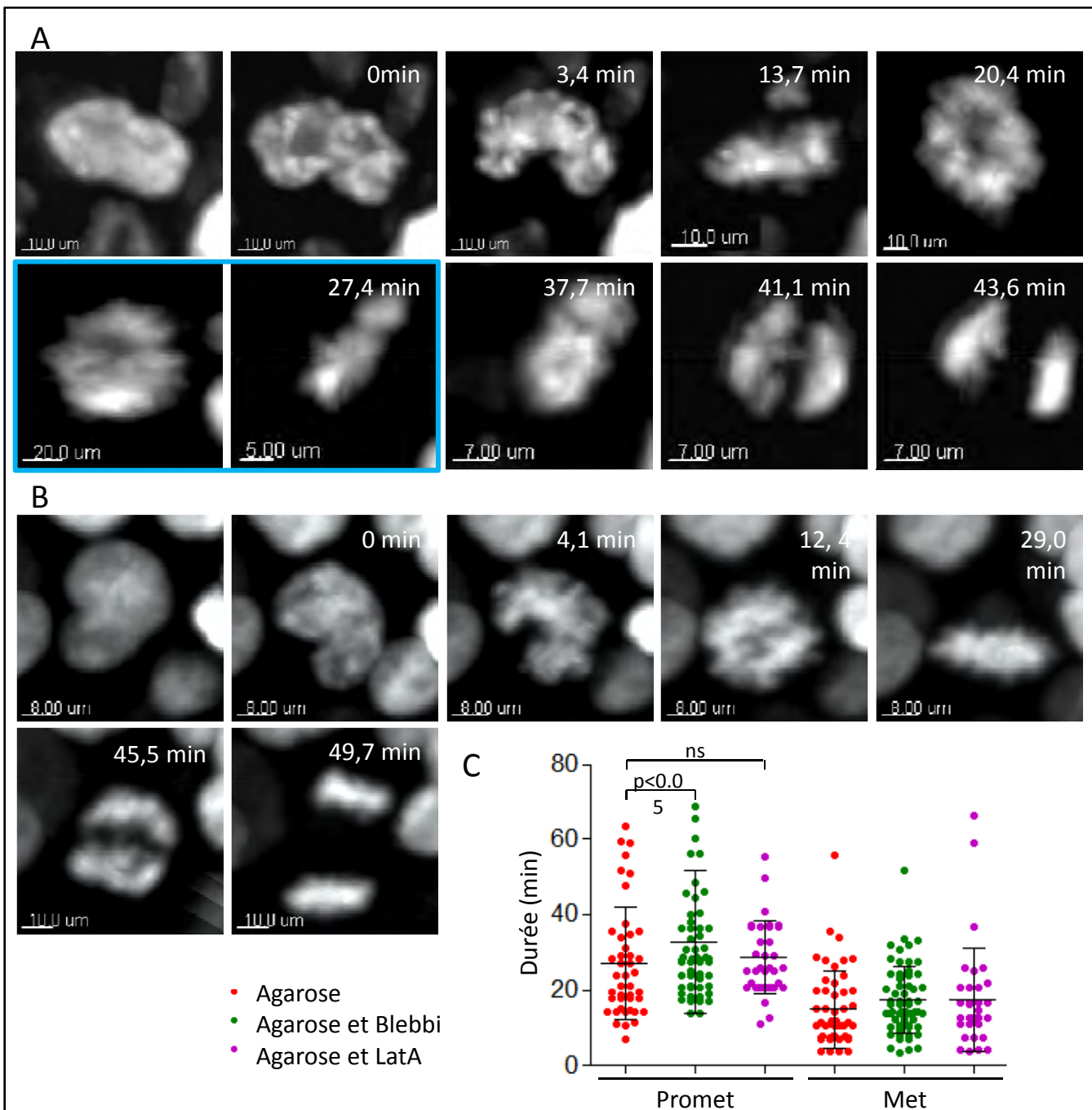


Figure 44 : Impact des traitements sur la durée des étapes de la mitose de cellules de sphéroïdes contraints dans de l'agarose

(A) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde traité à la Blebbistatine et contraint dans l'agarose depuis 24h, en représentation 3D d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). Une rosace est visible à 20,4 minutes. La plaque métaphasique est établie à 27,4 minutes, et l'anaphase se déroule à 41,1 minutes. Les images encadrées en bleue correspondent à la cellule au même temps (27,4 min), mais selon un angle de vue différent.

(B) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde traité à la Latrunculine A et contraint dans l'agarose depuis 24h, en représentation 3D d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). Une rosace se devine à 12,4 minutes. La plaque métaphasique est établie à 29,0 minutes, et l'anaphase se déroule à 45,5 minutes.

b) Déstabilisation de la dynamique d'assemblage des filaments d'actine par la Latrunculine A

Nous avons choisi d'inhiber l'assemblage des filaments d'actine en traitant les sphéroïdes avec la Latrunculine A [216]. La Latrunculine forme des complexes avec l'actine monomérique, et empêche ainsi son assemblage en filaments.

Les données de l'équipe montrent que sur des cellules cultivées en 2 dimensions au fond d'une boîte de pétri, les effets de la Latrunculine A sur l'organisation des filaments d'actine sont visibles dès 2h de traitement à 0,1 μ M. Nous avons donc choisi une concentration de 0,5 μ M afin d'assurer une déstabilisation correcte des filaments d'actine jusqu'en profondeur dans les sphéroïdes. Le marquage des filaments d'actine sur coupes à congélation de sphéroïdes contraints et traités à la Latrunculine A montre une forte désorganisation du réseau d'actine (**Figure 43**). L'actine corticale a presque disparu, et reste très disparate là où elle persiste encore. En d'autres endroits, il y a des accumulations très fortes d'actine sans qu'aucune architecture ne puisse être distinguée. Ce seul contrôle suffit à convaincre de la pénétration de la drogue jusqu'au sphéroïde contraint dans l'agarose.

2) Analyse de l'implication du cytosquelette d'actomyosine sur la durée des étapes de la mitose dans les sphéroïdes contraints

Nous avons traité les sphéroïdes à partir du moment où nous les avons transférés dans l'agarose 1% afin de faire coïncider l'effet des drogues avec le changement d'environnement mécanique. L'agarose dans lequel étaient contraints les sphéroïdes, et les milieux dans lesquels baignaient les sphéroïdes contraints comportaient tous les traitements aux concentrations choisies. Nous avons imagé la dynamique de progression en mitose des cellules dans les sphéroïdes 24h après (**Figure 44A** et **Films 7 et 8** concernant les sphéroïdes contraints traités à la Blebbistatine, et **Figure 44B** et **Films 9 et 10** concernant les sphéroïdes contraints traités à la Latrunculine A).

Figure 44 (suite de la légende) :

(C) Graphe représentant la durée (+/- déviation standard) de la prométaphase (Prometa) et la durée de métaphase (Met) pour les mitoses des sphéroïdes contraints non traités (rouge) et des sphéroïdes contraints traités avec la Blebbistatine (vert) ou avec la Latrunculine A (violet). Chaque point représente une mitose.

Les résultats des mesures de durées de la prométaphase et de la métaphase sont présentés dans la **figure 44C**.

La première conclusion déduite de ces mesures, est que la déstabilisation du cytosquelette dans les sphéroïdes contraints ne bloque pas la progression des cellules en mitose.

La Blebbistatine induit une légère augmentation de la durée moyenne de la prométaphase et n'en change que peu la distribution (33 ± 19 minutes, $n > 55$) par rapport aux sphéroïdes contraints non traités (27 ± 15 minutes). Les durées de prométaphase inférieures à 13 minutes n'apparaissent plus. Une sous-population de mitoses dont la durée de la prométaphase est particulièrement élevée, entre 50 et 70 minutes, est observée. La différence de durée de prométaphase entre ces deux conditions apparaît significative d'après les tests statistiques, mais au vu de la faible différence entre elles, nous considérons l'effet de l'inhibition de la myosine II sur l'induction du délai en prométaphase par les contraintes mécaniques comme étant faible.

De plus, la Blebbistatine n'induit qu'une très légère hausse de la durée de la métaphase.

La Latrunculine A n'induit pas d'augmentation de la durée de la prométaphase (29 ± 10 minutes, $n > 30$) comparativement à la condition contrainte non traitée. La dispersion de la population est légèrement diminuée. Une nouvelle fois, il n'y a pas d'effet net de la déstabilisation des filaments d'actine sur la durée de la métaphase.

En conclusion, ces résultats montrent que la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine ne semble pas avoir d'effet supplémentaire sur la progression en prométaphase dans les sphéroïdes contraints.

3) Analyse de l'implication du cytosquelette d'actomyosine dans le déroulement des mitoses dans les sphéroïdes contrôles

Pour déterminer si le cytosquelette d'actomyosine est impliqué dans le délai en prométaphase observé dans les mitoses des sphéroïdes contraints, il est nécessaire de vérifier l'impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine dans des sphéroïdes non contraints. En effet, nous pourrions vérifier si, en absence de contraintes mécaniques, la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine induit un délai en prométaphase. Si elle n'en

induit pas, c'est que le phénotype que nous observons n'impliquerait pas l'intégrité du cytosquelette d'actomyosine. Si elle en induit un, c'est que la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine pourrait mimer un effet de la contrainte, suggérant qu'en condition de croissance sous contrainte, le délai en prométaphase puisse impliquer une déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine. Cependant, ces résultats seront à étudier avec prudence, car la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine peut induire un délai en prométaphase en condition contrôle par un mécanisme différent de celui qui intervient dans la progression en prométaphase des sphéroïdes sous contrainte mécanique.

a) Analyse de la durée des étapes de la mitose

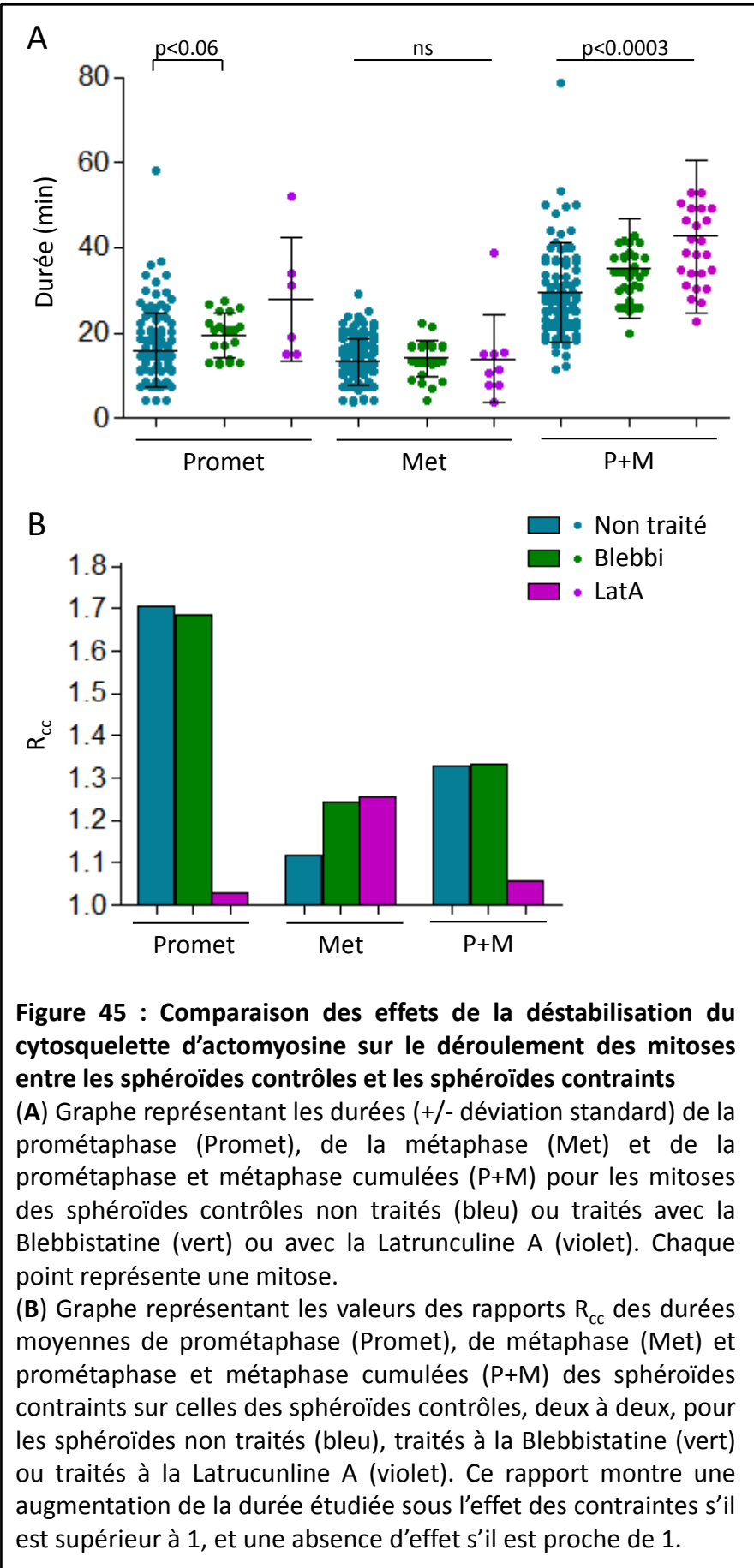
Les sphéroïdes contrôles ont été traités avec la Blebbistatine ou la Latrunculine A 24h avant d'imager la dynamique de progression en mitose des cellules au SPIM. Les résultats des mesures de durées de la prométaphase et de la métaphase sont présentés dans la **figure 45A**.

A nouveau, nous remarquons que même en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé, les cellules progressent en mitose dans les sphéroïdes non contraints.

Cependant, l'analyse des durées des phases montrent que la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine a un impact différent dans les sphéroïdes contrôles que dans les sphéroïdes contraints. L'inhibition de la fonction de la myosine II fait disparaître les durées de prométaphases inférieures à 10 minutes et celles supérieures à 30 minutes ($n > 20$). En conséquence, la durée moyenne des prométaphases dans les sphéroïdes contrôles traités à la Blebbistatine est légèrement supérieure à celle des sphéroïdes contrôles non traités (19 +/- 5 minutes contre 16 +/- 9 minutes). De la même façon, la Blebbistatine semble réduire la dispersion des valeurs de durée de métaphase par rapport à la condition non traitée.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la fonction ATPase de la myosine II n'empêche pas le déroulement de la mitose mais réduit les variations possibles de durée de ces étapes.

La Latrunculine A rend beaucoup plus difficile l'analyse de la durée des étapes de la mitose, et particulièrement de l'étape de prométaphase, pour une raison principale : elle induit un



grand nombre de divisions multipolaires (voir **Partie 5**) et l'absence d'établissement d'une plaque métaphasique ne permet pas de déterminer les durées de prométaphases et de métaphases des cellules mitotiques multipolaires des sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A. Il en résulte un faible nombre d'observations pour lesquelles les durées des phases sont mesurables.

L'imagerie des sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A a été assez délicate, car le réglage de la feuille de lumière du SPIM ne semblait jamais être optimal pour observer l'échantillon sur une profondeur suffisante. Ceci est probablement lié au fait que le traitement rend la surface des sphéroïdes granuleuse, modifie certainement l'organisation des sphéroïdes en profondeur, et perturbe la pénétration de la feuille de lumière.

Etant donné le faible nombre de durées de prométaphases ou de métaphases obtenues en condition contrôle traitée Latrunculine A, une attention plus particulière a été portée sur la durée cumulée de la prométaphase et de la métaphase (P+M, c'est-à-dire depuis la condensation jusqu'à l'anaphase) en incluant les divisions multipolaires afin d'avoir davantage de valeurs (n=25). Les mesures révèlent une augmentation de la durée moyenne de la division et de sa dispersion, dans les sphéroïdes traités à la Latrunculine A (43 +/- 18 minutes contre 30 +/- 12 minutes en condition non traitée). Ainsi, l'inhibition de l'assemblage des filaments d'actine induit un allongement de la durée des mitoses dans les sphéroïdes non contraints.

b) Analyse du rapport des durées entre conditions contrainte et contrôle

Afin de comparer les durées mesurées entre les mitoses des sphéroïdes contrôles et celles de sphéroïdes contraints pour chaque condition (non traitée, traitée à la Blebbistatine ou traitée à la Latrunculine A), le rapport de la durée moyenne dans les sphéroïdes contraints sur celle des sphéroïdes contrôles a été calculé pour chaque étape de la mitose, en les comparant deux à deux selon les conditions de traitement ou d'absence de traitement (**Figure 45B**). Ce rapport est noté « contraint sur contrôle » $R_{cc}(Promet)$ pour la comparaison de durées de prométaphases, $R_{cc}(Met)$ pour la comparaison de durées de métaphase, et $R_{cc}(P+M)$ pour la comparaison de durées de prométaphases et métaphases cumulées.

En condition non traitée, $R_{cc}(Promet)$ est égal à 1,70 et démontre d'une autre façon que la contrainte mécanique induit effectivement une augmentation de la durée de la prométaphase. Cependant, comme il a déjà été démontré plus haut, la contrainte mécanique a peu d'impact sur la durée de la métaphase ($R_{cc}(Met) = 1,12$). Par ailleurs, la différence statistique de ces durées entre les conditions contrôles et contraintes est significative pour les durées de prométaphases ($p < 0,0001$) mais ne l'est pas pour les durées des métaphases.

La valeur de $R_{cc}(Promet)$ pour les sphéroïdes traités à la Blebbistatine ($R_{cc}(Promet) = 1,68$) est équivalente à celle des sphéroïdes non traités. Ce résultat est également souligné par une différence statistique de cette durée entre les conditions contrôles et contraintes traitées à la Blebbistatine significative ($p < 0,0001$). Par contre, la Blebbistatine induit une légère augmentation de la durée de la métaphase en condition contrainte ($R_{cc}(Met) = 1,24$) mais dont la différence avec la condition contrôle n'est pas significative.

Concernant les sphéroïdes traités à la Latrunculine A, le rapport $R_{cc}(P+M)$ est le plus exploitable car il a été déterminé à partir d'un plus grand nombre de valeurs. On note que la contrainte mécanique n'induit pas d'augmentation de la durée P+M dans les sphéroïdes traités à la Latrunculine A ($R_{cc}(P+M) = 1,06$, la différence statistique des durées P+M entre la condition contrôle et la condition contrainte est non significative).

Il n'y a que peu de valeurs des durées de prométaphases et de métaphases en condition contrôle traitée à la Latrunculine A, mais c'est pourtant l'étude de leur rapport qui permettrait de préciser le rôle de la dynamique des filaments d'actine dans l'allongement de la prométaphase sous l'effet des contraintes. Toutefois, ces rapports $R_{cc}(Promet)$ et $R_{cc}(Met)$ peuvent être analysés, avec prudence et en considérant qu'ils doivent absolument être confirmés avec davantage de mesures de durées des mitoses dans les sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A.

$R_{cc}(Promet)$ est très proche de 1 et montre qu'il n'y aurait pas d'augmentation de la durée de la prométaphase sous l'effet des contraintes lorsque les sphéroïdes sont traités à la Latrunculine. A nouveau, il n'y a pas de différence significative de durée de prométaphase entre la condition contrôle et celle contrainte. Les durées moyennes de prométaphases des sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A et des sphéroïdes contraints non traités sont

équivalentes (28 +/- 15 et 27 +/- 15) et de distributions semblables (**Figure S3**). Ainsi, même avec un faible nombre de valeurs, l'analyse des durées de prométaphases s'accorde avec celle des durées de P+M.

A l'inverse, et de la même manière que la Blebbistatine, la Latrunculine A induirait une légère augmentation de la durée de la métaphase en condition contrainte ($R_{cc}(Met) = 1,26$, toutefois la différence de durées de métaphases reste non significative).

En conclusion, ces résultats montrent d'une part que le traitement par la Blebbistatine réalisé dans cette étude ne modifie pas l'effet de la contrainte mécanique sur le déroulement de la mitose. D'autre part, la Latrunculine induit un délai en prométaphase dans les sphéroïdes contrôles qui semble similaire à celui induit par la contrainte mécanique.

4) Discussion

La Blebbistatine a un impact faible sur le déroulement de la mitose dans les sphéroïdes contrôles et dans les sphéroïdes contraints, suggérant que la contractilité du cytosquelette d'actomyosine n'est probablement pas l'élément qui est perturbé par la contrainte mécanique et qui serait responsable du délai en prométaphase, car son inhibition aurait réduit l'allongement en prométaphase induit par la contrainte. Ce n'est pas non plus, à priori, un élément impliqué davantage dans la prométaphase des mitoses des sphéroïdes sous contraintes mécaniques que dans celles des sphéroïdes contrôles, car son inhibition aurait induit une augmentation plus importante de la durée de prométaphase dans les sphéroïdes contraints. La myosine II n'a probablement qu'une implication mineure dans le déroulement de la prométaphase en condition contrainte.

La Latrunculine, quant à elle, induit un délai en prométaphase dans les sphéroïdes contrôles qui correspond à celui induit par la contrainte mécanique.

De cette observation résultent deux hypothèses :

- Soit la Latrunculine empêche les cellules d'ajuster le déroulement de leur mitose à leur environnement. Ainsi, que ce soit en condition contrôle ou en condition contrainte, les délais observés sont identiques. L'inhibition des filaments d'actine impacte donc la progression en mitose, mais de façon indépendante de la contrainte

mécanique. Cette hypothèse serait vérifiée si les effets de l'inhibition des filaments d'actine et ceux de la contrainte mécanique ne s'accumulent pas : le délai en prométaphase serait identique à celui induit par la contrainte mécanique.

- Soit la Latrunculine A reproduit le phénotype induit par la contrainte mécanique. Ainsi, le déroulement des mitoses dans les sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine serait identique au déroulement des mitoses dans les sphéroïdes contraints non traités.

Si l'on compare les durées de P+M entre ces deux conditions (**Figure S3**), on note que les durées moyennes sont proches (43 +/- 18 et 39 +/- 20 minutes respectivement) et pourraient soutenir la deuxième hypothèse. Cependant, les distributions des durées ne sont pas tout à fait semblables : en condition contrôle traitée à la Latrunculine, les durées sont régulièrement distribuées entre 25 et 50 minutes, alors que l'on devine deux populations de mitoses dont les durées sont comprises entre 20 et 40 minutes d'une part, et de 50 à 80 minutes d'autre part dans la condition contrainte non traitée.

Si la tendance des mesures obtenues en condition contrôle traitée à la Latrunculine A s'avère correcte, ceci confirmerait que la dynamique des filaments d'actine est soit nécessaire à la perception des contraintes mécaniques et à l'ajustement du déroulement de la prométaphase en conséquence, soit que cette dynamique est perturbée en condition contrainte de la même manière qu'elle l'est par la Latrunculine A. Une étude précise de l'organisation et de la dynamique des filaments d'actine dans les sphéroïdes contraints permettrait de trancher entre ces hypothèses.

Toutefois, les cellules mitotiques parviennent à établir une plaque métaphasique et à progresser en anaphase, même en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé. A la lumière de ces résultats, il devient envisageable que des mécanismes indépendants du cytosquelette d'actomyosine puissent être mis en jeu pour l'établissement du fuseau mitotique fonctionnel dans les cellules en mitose au sein de sphéroïdes contrôles ou contraints. Effectivement, plusieurs données bibliographiques montrent que la division cellulaire peut être réalisée en l'absence d'un cytosquelette d'actine fonctionnel.

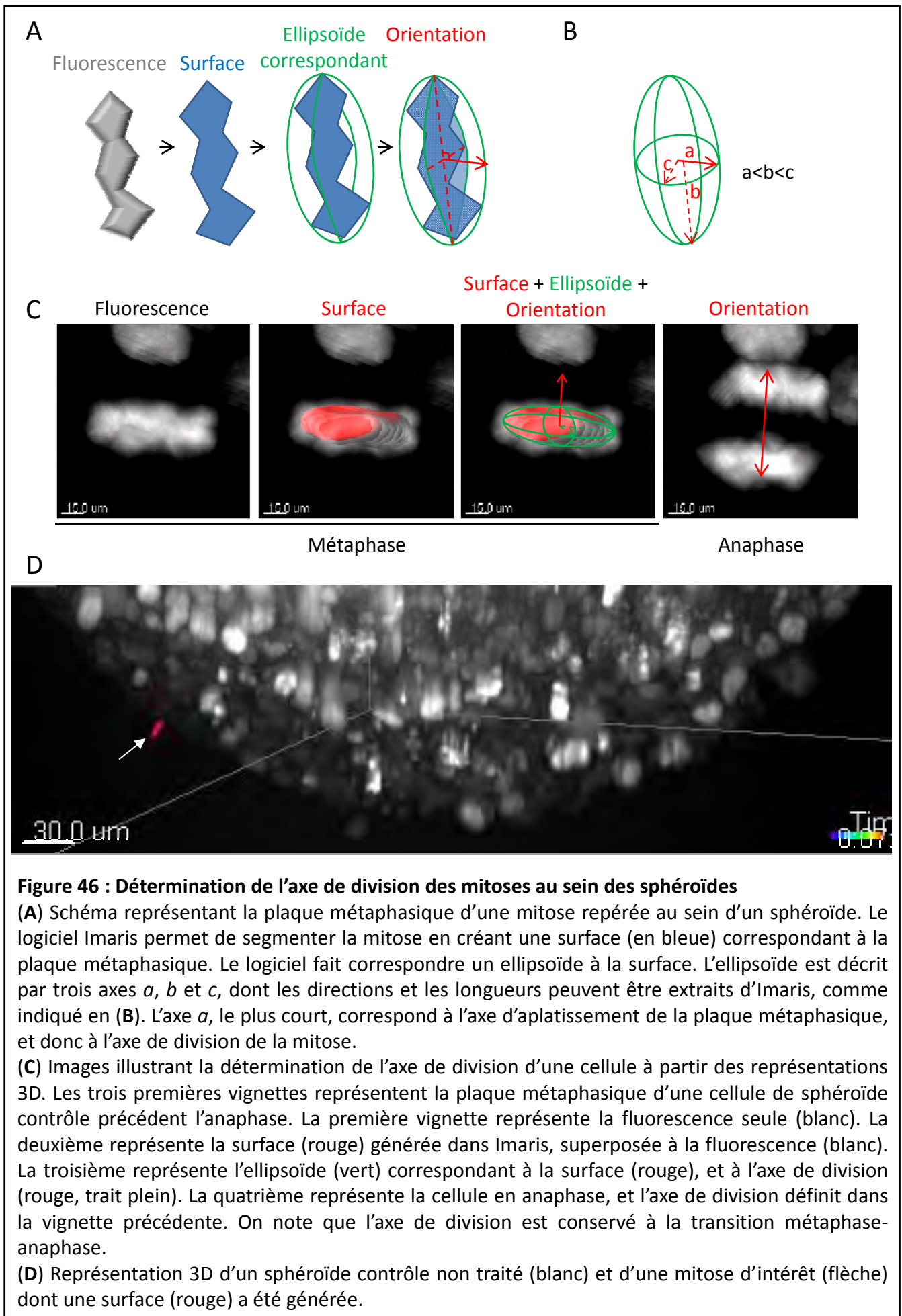
Ce premier exemple illustre la restauration des fonctions du cytosquelette d'actomyosine sous une certaine forme de culture cellulaire. Kunda *et al.* [217] parvient à restaurer la

tension corticale nécessaire à l'établissement correct du fuseau mitotique dans des cellules déplétées en Moésine. Ces cellules ne peuvent assembler les filaments d'actine à la membrane. Cependant, lorsque les cellules sont en suspension dans de la Concanaviline A qui est capable d'organiser le cortex depuis l'extérieur de la cellule, la rigidité cellulaire est récupérée, la cellule devient ronde, le fuseau mitotique se met en place correctement et la cellule se divise avec succès. Ils montrent que la restauration de la rigidité corticale suffit à restaurer une morphogénèse normale du fuseau.

Ce deuxième exemple illustre l'indépendance possible au cytosquelette d'actomyosine pour l'établissement du fuseau mitotique dans un modèle multicellulaire. Cao *et al.* [210] montrent que l'inhibition de l'assemblage des filaments d'actine par la Latrunculine A dans des embryons de *Drosophile* n'empêche pas la mise en place du fuseau mitotique. Ils soulèvent la possibilité qu'un autre mécanisme intervienne dans la séparation tardive des centrosomes après la dislocation de l'enveloppe nucléaire.

Par ailleurs, les travaux de Balzer *et al.* [218], bien qu'ils ne s'intéressent pas à la division cellulaire mais à la migration cellulaire, démontrent que le confinement physique induit une prise en charge de l'activité migratoire des cellules par les microtubules en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé. Alors que le cytosquelette d'actomyosine reste le composant clé de la migration, ces travaux prouvent que dans certaines conditions de contrainte mécanique, la cellule peut poursuivre sa destinée en l'absence de cytosquelette d'actomyosine actif.

D'après ces exemples, il est possible que la croissance sous forme de sphéroïde puisse modifier la tension corticale des cellules, l'organisation de leur cytosquelette d'actomyosine ou les fonctions des microtubules, de telle sorte que leur dépendance au cytosquelette d'actomyosine soit diminuée.



PARTIE 4 :

ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR L'ORIENTATION DE L'AXE DE DIVISION DES MITOSES AU SEIN DES SPHEROIDES

Nous avons montré que le cytosquelette d'actine n'est pas indispensable à la progression en mitose et à l'établissement d'un fuseau mitotique, puisque les cellules des sphéroïdes traités parviennent à terminer leur mitose. Pourtant, les données bibliographiques montrent que le cytosquelette d'actomyosine participe également au contrôle de l'orientation du fuseau mitotique [139, 209]. **Dans ce contexte, une attention particulière a été portée à l'impact de la contrainte mécanique sur l'orientation de l'axe de division des mitoses au sein des sphéroïdes, et sur le rôle du cytosquelette d'actomyosine dans la détermination de l'orientation de l'axe de division.**

1) Analyse de l'orientation de l'axe de division des cellules dans les sphéroïdes contrôles et contraintes.

L'orientation de l'axe de division des cellules en mitose au sein des sphéroïdes a été analysée en 3 dimensions, à partir des acquisitions en temps réel réalisées au SPIM et décrites dans la seconde partie.

L'axe de division est déterminé par la droite passant par les deux pôles du fuseau mitotique. La plaque métaphasique s'établit sur un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique et donc à l'axe de division. Aucun mouvement de rotation de l'axe de division n'étant visible entre la métaphase et l'anaphase sur les séquences étudiées, il est défini comme étant l'axe perpendiculaire au plan de la plaque métaphasique au temps précédant l'anaphase (**Figure 46C**).

La méthode utilisée est détaillée dans la section "Matériel et méthodes". Brièvement, l'axe de division de chaque cellule en mitose est défini à partir de l'ellipsoïde plein, aplati et homogène formé par l'organisation de la plaque métaphasique (**Figure 46A-C**). Chaque plaque métaphasique est segmentée en 3D, et de la surface créée correspondant à la plaque métaphasique peuvent être extraits des paramètres descriptifs, dont celui de l'ellipsoïde

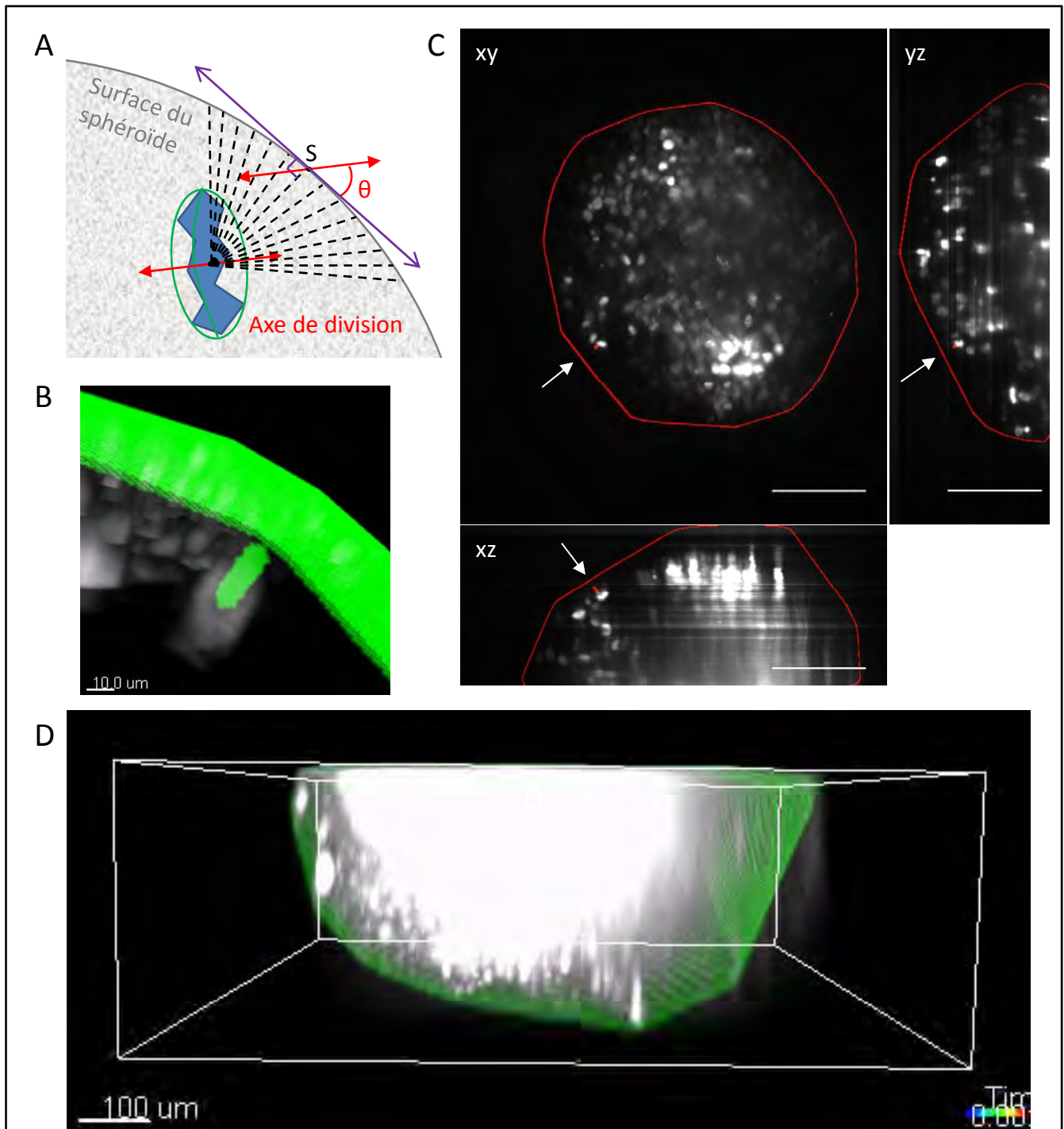


Figure 47 : Détermination de l'enveloppe des sphéroïdes par le script Matlab

(A) Schéma représentant une mitose d'intérêt au sein d'un sphéroïde, dont l'axe de division est déterminé en rouge. Le référentiel utilisé pour déterminer l'orientation de l'axe de division θ est l'axe tangent à la surface du sphéroïde, indiqué en violet, au point le plus proche à la surface du sphéroïde, nommé S.

(B) Zoom sur une mitose d'intérêt provenant du sphéroïde présenté en (D), dont l'enveloppe a été coupée pour permettre de mieux voir la mitose et le segment la reliant à la surface.

(C) Vues orthogonales des plans xy (en haut à gauche), yz (en haut à droite) et xz (en bas) d'un sphéroïde contrôle non traité (blanc) et de l'enveloppe déterminée par le script Matlab (rouge). L'enveloppe correspond correctement au pourtour du sphéroïde, et ce dans les 3 plans. Les flèches indiquent une mitose d'intérêt. Un segment rouge la relie au point S le plus proche à la surface. Barre d'échelle : 100 μm .

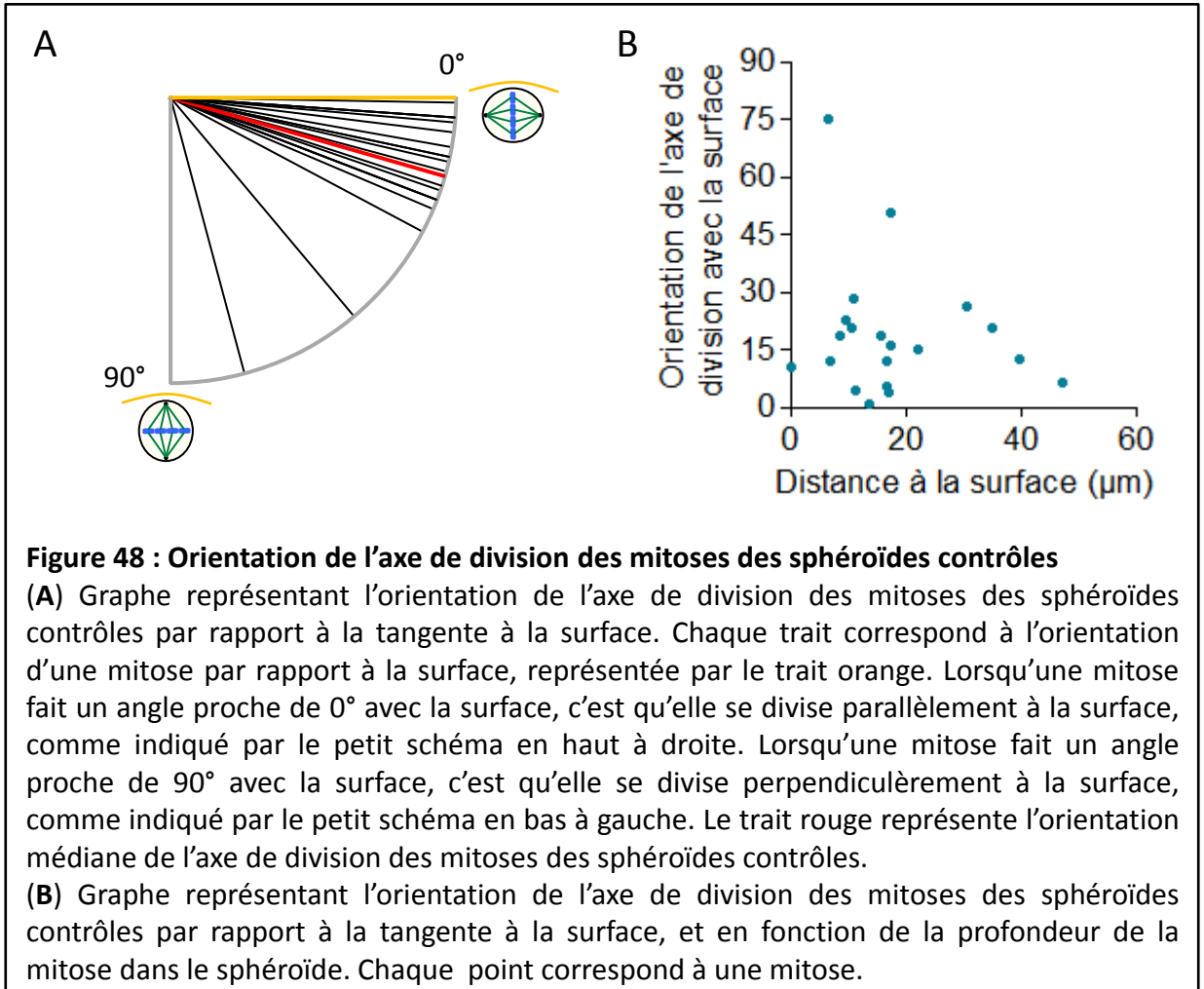
(D) Représentation 3D d'un sphéroïde contrôle non traité (blanc, aux contrastes exagérés pour en percevoir plus nettement le volume) et de l'enveloppe déterminée par le script (vert).

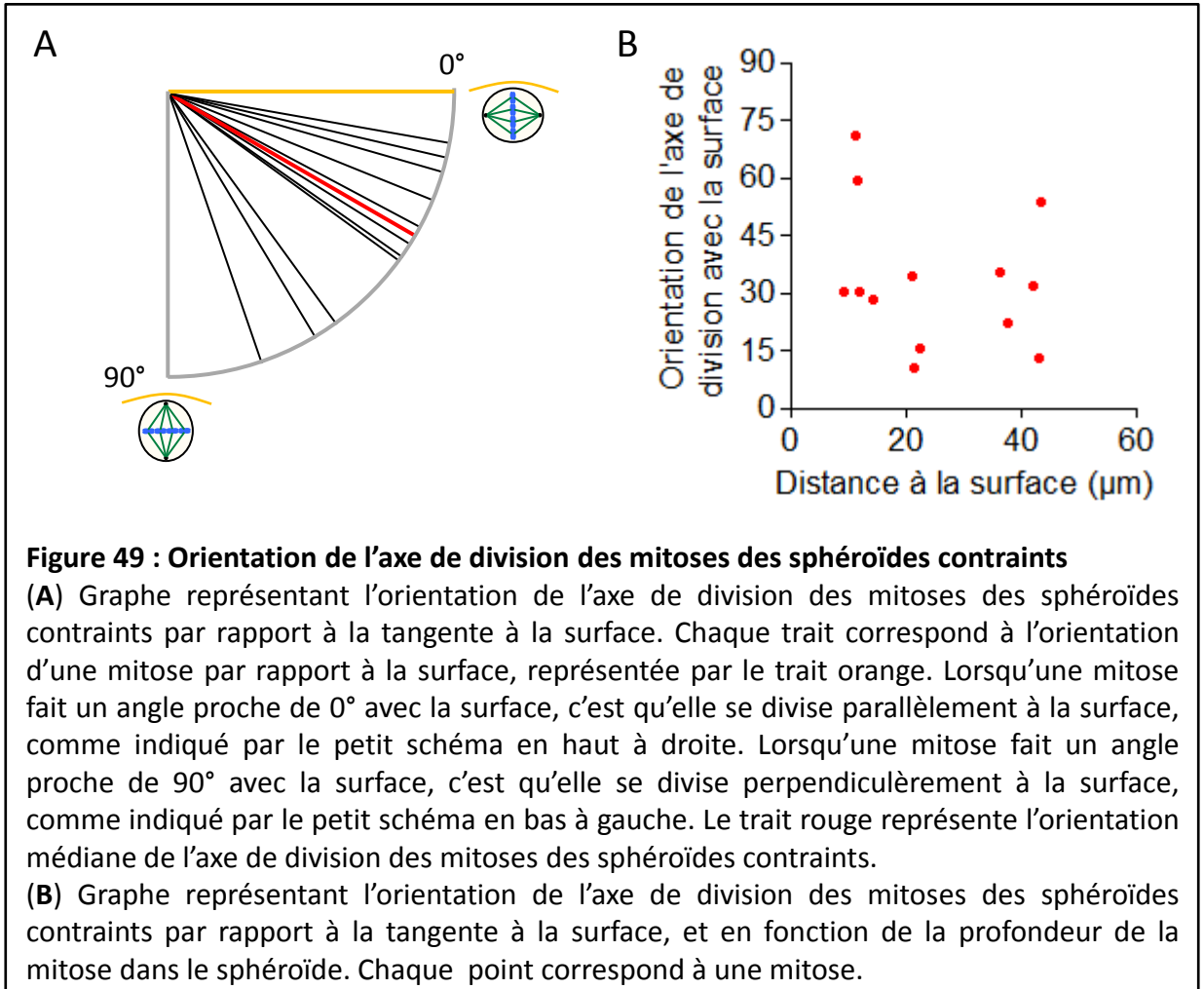
correspondant à la surface. Un ellipsoïde est caractérisé par trois axes d'orientations perpendiculaires et de longueurs différentes (**Figure 46B**). L'axe le plus court, correspondant à l'axe d'aplatissement, est orienté dans le sens de l'axe de division, le long de la droite fictive liant les deux pôles du fuseau. L'orientation de cet axe indique donc l'orientation de l'axe de division de la mitose. L'orientation de l'axe de division est mesurée par rapport à la tangente à la surface du sphéroïde, au point de la surface le plus proche de la cellule en mitose (**Figure 47A**). L'enveloppe du sphéroïde, le point à la surface le plus proche de la mitose, la profondeur et l'orientation de son axe de division sont déterminés par un programme Matlab développé et écrit par le Dr. Pierre Weiss, un mathématicien de l'équipe PRIMO de l'ITAV. Une valeur d'orientation de l'axe de division proche de 0° signifie que la cellule se divise parallèlement à la surface. Une orientation proche de 90° signifie que la cellule se divise perpendiculairement à la surface.

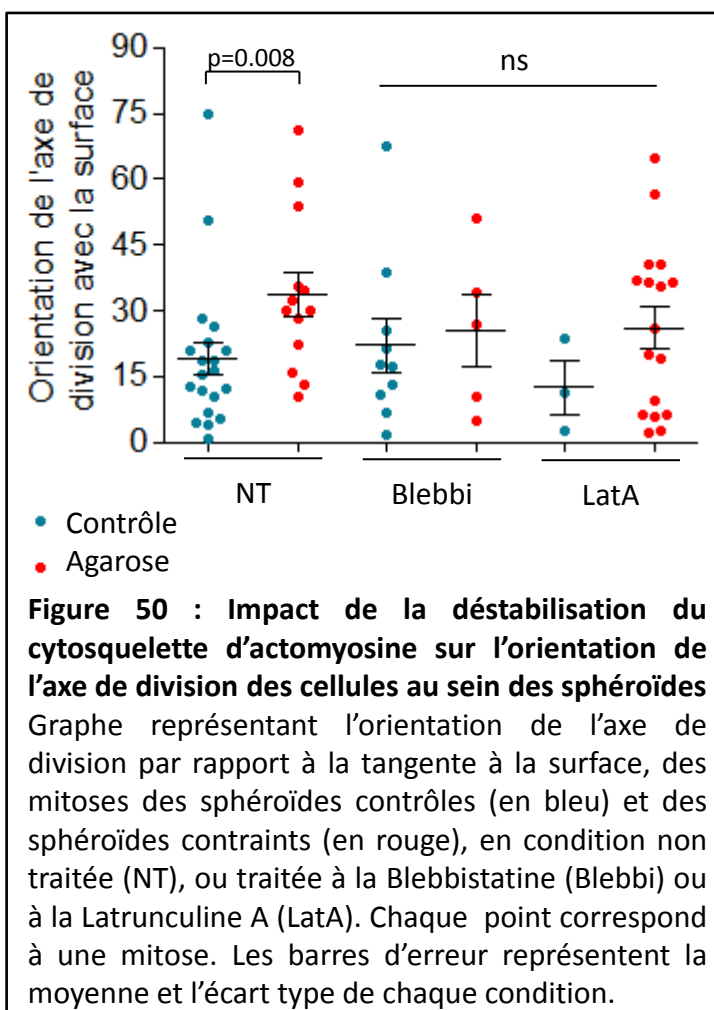
L'analyse de l'orientation des mitoses au sein des sphéroïdes contrôles révèle tout d'abord une orientation préférentielle des divisions parallèlement à la surface (**Figure 48A**). En effet, les cellules se divisent avec une orientation faisant en moyenne un angle de 19° ($\pm 17^\circ$, $n=20$) avec la surface du sphéroïde. La distribution des orientations reste relativement large. La **Figure 48B** présente la distribution de l'orientation des axes de division en fonction de la distance à la surface. L'orientation préférentielle de l'axe de division semble maintenue sur une cinquantaine de microns de profondeur, dans des sphéroïdes de $700\mu\text{m}$ de diamètre.

Les résultats de mesures de l'orientation de l'axe de division des mitoses dans les sphéroïdes contraints en agarose (**Figure 49A**) montrent que, de façon identique aux sphéroïdes contrôles, les divisions se font en moyenne avec une orientation préférentiellement parallèle à la surface. Toutefois, l'orientation moyenne est légèrement déviée ($34 \pm 18^\circ$, $n=13$) par rapport à l'orientation de division dans les sphéroïdes contrôles.

En conclusion, la contrainte mécanique induit une modification de l'orientation de l'axe de division des mitoses au sein des sphéroïdes. Cependant, la différence d'orientation de l'axe de division entre les mitoses des sphéroïdes contrôles et celles des sphéroïdes contraints reste faible (15°). La contrainte mécanique induite par la croissance des sphéroïdes en







agarose semble donc n'avoir qu'un effet mineur sur la détermination de l'orientation de l'axe de division.

2) Analyse du rôle du cytosquelette d'actomyosine dans la détermination de l'orientation de l'axe de division des cellules

Sous contrainte mécanique, il semble que les cellules peuvent se passer du cytosquelette d'actomyosine pour progresser en mitose. Cependant, il est possible que cette progression s'accompagne d'un défaut d'orientation de l'axe de division. Afin de vérifier la dépendance au cytosquelette d'actomyosine pour l'orientation de l'axe de division, en condition contrôle et en condition contrainte, les mêmes analyses que précédemment ont été effectuées sur les sphéroïdes traités à la Blebbistatine et à la Latrunculine A (**Figure 50**).

a) Analyse de l'orientation de l'axe de division

L'analyse de l'orientation de l'axe de division des mitoses dans les sphéroïdes contrôles dont le cytosquelette d'actomyosine a été déstabilisé par la Blebbistatine montre que la Blebbistatine n'affecte pas l'orientation préférentielle de l'axe de division des cellules ($22 \pm 19^\circ$, $n = 10$). Il semblerait que l'activité de la myosine II ne soit pas indispensable à la détermination de l'orientation de l'axe de division dans les sphéroïdes contrôles. En condition contrainte, malgré le faible nombre de mesures, il semblerait que l'orientation préférentiel de l'axe de division soit conservé ($25 \pm 19^\circ$, $n=5$) et que l'effet de la contrainte mécanique sur la détermination de l'orientation de l'axe de division soit inhibé par la Blebbistatine. Plus de mesures permettraient de préciser si l'activité de la myosine II induit une légère modification de l'orientation de l'axe de division dans les sphéroïdes sous contrainte.

Dans les sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A, il semblerait que l'inhibition des filaments d'actine n'empêche pas une orientation préférentielle de l'axe de division parallèlement à la surface ($13 \pm 11^\circ$, $n=3$) des cellules effectuant une division bipolaire. Dans les sphéroïdes contraints, la Latrunculine A ne semble pas induire de modification de l'orientation de l'axe de division ($26 \pm 19^\circ$, $n = 17$), bien que la dispersion paraisse plus importante.

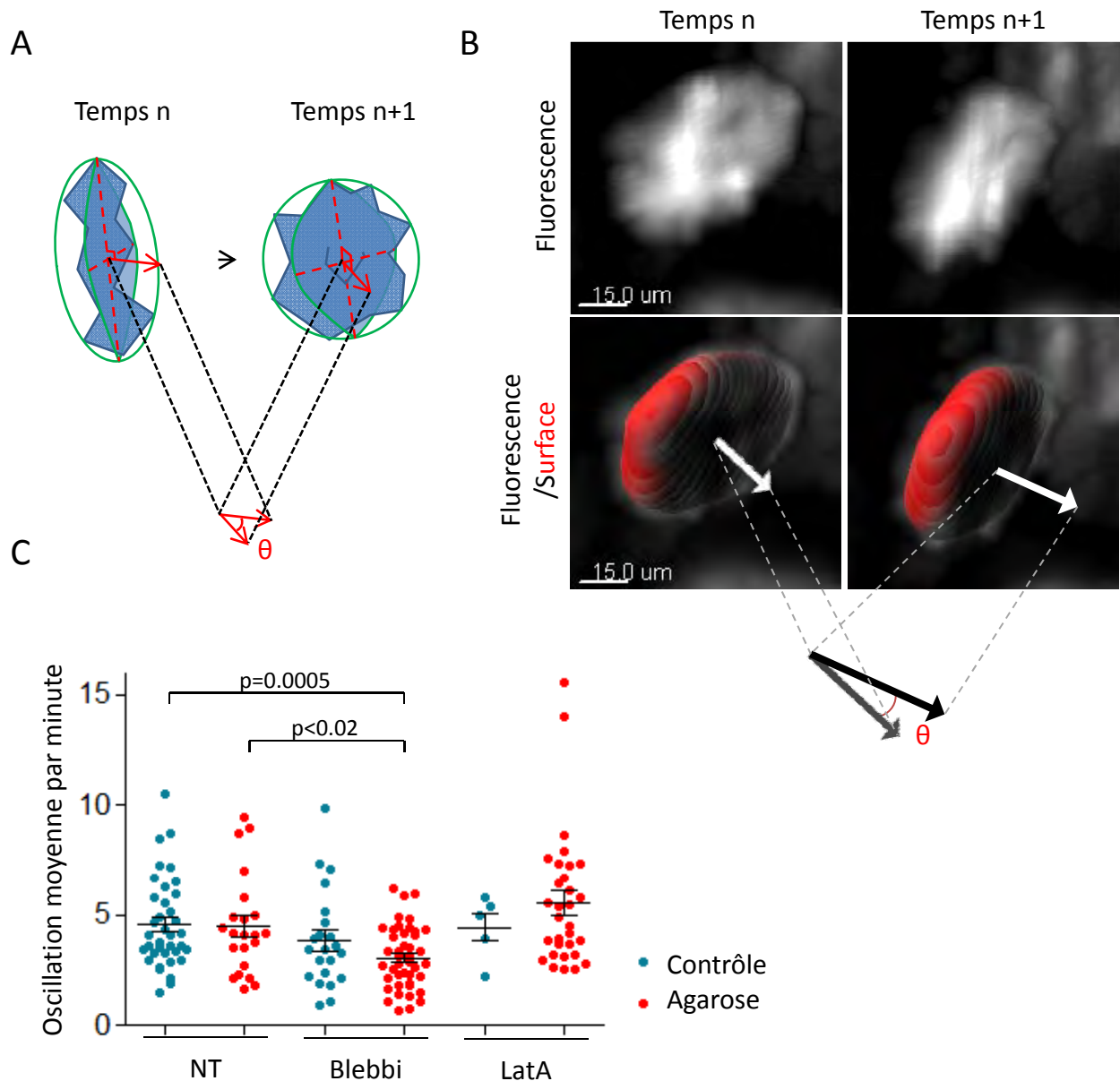


Figure 51 : Etude de l'oscillation de la plaque métaphasique des mitoses des sphéroïdes

(A) Représentation schématisée de la détermination de l'oscillation de la plaque métaphasique. L'oscillation moyenne, pour une mitose, est la moyenne des angles de rotation effectués entre chaque pas de temps compris entre l'établissement d'une plaque métaphasique jusqu'au temps précédent l'anaphase. L'angle de rotation de la plaque métaphasique, nommé θ , correspond à l'angle entre la normale à la plaque métaphasique à un temps n et celle au temps n+1. La normale à la plaque métaphasique est mesurée de la même façon que pour la mesure de l'orientation de l'axe de division.

(B) Représentation de la mesure de l'angle de rotation de la plaque métaphasique entre le temps n et n+1, à partir de photos de la représentation 3D d'une mitose. Les images du haut représentent la fluorescence de l'ADN. L'image du bas représente la surface créée à partir de cette fluorescence. L'ellipsoïde correspondant à cette surface permet d'extraire l'axe normal à la plaque métaphasique, indiqué en blanc sur les images.

(C) Graphe représentant l'oscillation moyenne de la plaque métaphasique par minute, des mitoses des sphéroïdes contrôles (en bleu) et des sphéroïdes contraints (en rouge), en condition non traitée (NT), ou traitée à la Blebbistatine (Blebbi) ou à la Latrunculine A (LatA). Chaque point correspond à une mitose. Les barres d'erreur représentent la moyenne et l'écart type de chaque condition.

En conclusion, les filaments d'actine ne semblent pas nécessaires à la détermination de l'orientation de l'axe de division des cellules dans les sphéroïdes contrôles ou contraints.

b) Analyse de l'oscillation de la plaque métaphasique

Les acquisitions de la progression en mitose des cellules montrent qu'avant de se stabiliser pour progresser en anaphase, la plaque métaphasique oscille. Ce paramètre peut être un reflet de la capacité d'ajustement de l'orientation de la plaque métaphasique. Etant donné que les mouvements de l'actine corticale par la myosine II participent au positionnement des pôles du fuseau par le biais des microtubules astraux, ils participent probablement à l'oscillation de la plaque métaphasique. L'analyse de l'oscillation de la plaque métaphasique permettrait de vérifier si l'orientation de l'axe de division est déterminée dès le début de la formation du fuseau mitotique ou si elle est ajustée pendant l'établissement de la plaque métaphasique.

L'oscillation est déterminée comme étant l'amplitude de mouvement de la plaque métaphasique par unité de temps. Pour la mesurer, l'angle de rotation que fait la plaque métaphasique est noté entre chaque pas de temps précédant l'anaphase, à partir du moment où une rosace chromosomique ou une plaque métaphasique est détectable (**Figure 51A-B, Films 11A et B**). La moyenne de ces angles donne l'amplitude d'oscillation par pas de temps pour chaque mitose. Pour plus d'homogénéité, ces amplitudes ont été ramenées à la minute. La **Figure 51C** montre l'amplitude moyenne d'oscillation par minute effectuée par chaque plaque métaphasique, pour chaque condition de croissance des sphéroïdes.

En condition contrôle non traitée, l'oscillation moyenne est de $4,6^{\circ}/\text{min}$ ($\pm 2,0^{\circ}/\text{min}$, $n=37$). Ce paramètre est absolument inchangé dans les sphéroïdes contraints ($4,5^{\circ}/\text{min} \pm 2,3^{\circ}/\text{min}$, $n=22$). La contrainte mécanique n'affecte donc pas l'oscillation de la plaque métaphasique.

La Blebbistatine diminue légèrement l'oscillation de la plaque métaphasique dans les sphéroïdes contrôles ($3,9^{\circ}/\text{min} \pm 2,2^{\circ}/\text{min}$, $n=22$). Cette inhibition est amplifiée dans les sphéroïdes contraints ($3,1^{\circ}/\text{min} \pm 1,4^{\circ}/\text{min}$, $n=44$). La différence avec les conditions non traitées n'est significative que pour les sphéroïdes traités à la Blebbistatine et contraints. Il

semblerait que la myosine II soit plus nécessaire à l'oscillation de la plaque métaphasique dans les sphéroïdes sous contraintes que dans les sphéroïdes contrôles.

La Latrunculine A ne semble pas avoir d'impact sur l'oscillation de la plaque métaphasique dans les sphéroïdes contrôles, mais le faible nombre de mesures ne permet pas de conclure ($4,5^\circ/\text{min} \pm 1,4^\circ/\text{min}$, $n=5$). Dans les sphéroïdes contraints, la Latrunculine A augmente légèrement l'oscillation de la plaque métaphasique ($5,6^\circ/\text{min} \pm 3,1^\circ/\text{min}$, $n=31$), mais de façon non significative.

D'une façon générale, la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine n'a que peu d'impact sur l'oscillation de la plaque métaphasique. On peut simplement penser que la myosine II augmente l'amplitude d'oscillation de la plaque métaphasique de façon contrôlée. Ce contrôle est perdu si l'actine corticale est désassemblée. Il semble donc que l'ajustement de l'orientation de l'axe de division se fasse au cours de la mitose, même en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé.

3) Discussion

Comme décrit en introduction, les jonctions intercellulaires, la forme des cellules et la topologie tissulaire participent toutes trois à l'orientation de l'axe de division des cellules. Nos résultats montrent que dans les sphéroïdes contrôles, l'axe de division des cellules en mitose est préférentiellement parallèle à la surface. Nous supposons que cette orientation préférentielle dépend de l'organisation multicellulaire des sphéroïdes intégrant les jonctions cellule-cellule, les jonctions cellule-matrice et les tensions intercellulaires.

Nos résultats montrent par ailleurs que les contraintes mécaniques paraissent modifier légèrement l'orientation moyenne de l'axe de division des cellules au sein des sphéroïdes. Cette influence des contraintes ne semble pas impliquer le cytosquelette d'actomyosine puisque nos résultats prouvent que les traitements n'induisent pas de modifications de l'orientation de cet axe. Le cytosquelette d'actomyosine n'aurait qu'un rôle mineur. Dans chacune des conditions analysées, l'oscillation des plaques métaphasiques des cellules est maintenue, suggérant que les cellules conservent la capacité d'ajuster l'orientation de leur axe de division.

De ce fait, il est envisageable que la croissance des sphéroïdes sous contrainte mécanique modifie la forme des cellules ou la distribution des jonctions intercellulaires, et que ces

modifications entraînent une orientation de l'axe de division légèrement différente de celle des sphéroïdes en suspension. Dans cette condition, l'orientation préférentielle de l'axe de division des cellules est adaptée à l'environnement des cellules.

Ainsi, la comparaison de l'organisation multicellulaire entre les sphéroïdes contrôles et les sphéroïdes contraints apporterait certains éléments de réponse quant au contrôle de l'orientation de l'axe de division des cellules des sphéroïdes sous contrainte mécanique.

Par ailleurs, il est surprenant que l'inhibition du cytosquelette d'actomyosine n'impacte pas davantage l'orientation préférentielle de l'axe de division des cellules. Les cellules ayant un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé parviennent peut-être à positionner le fuseau mitotique correctement, de la même façon qu'elles parviennent à établir une plaque métaphasique et à progresser en anaphase par la suite. Ce positionnement correct peut être permis par l'intervention d'autres mécanismes. Par exemple, une étude de Woolner *et al.* [219] effectuée sur de l'épithélium d'embryon de grenouille, montre que la localisation et l'orientation de l'axe de division ne sont que peu altérées par l'inhibition du cytosquelette d'actomyosine car elles mettent en jeu de façon redondante le cytosquelette des microtubules. Il est possible qu'en dépit de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine, l'architecture tissulaire du sphéroïde soit suffisamment maintenue pour que l'orientation préférentielle de l'axe de division soit conservée.

Afin de vérifier toutes ces hypothèses, il paraît nécessaire de corréler l'orientation de l'axe de division des cellules à l'organisation multicellulaire du sphéroïde, pour chaque condition de culture.

Cette analyse permettrait également de vérifier l'hypothèse selon laquelle la désorganisation tissulaire induite par un défaut d'orientation de l'axe de division est un facteur amplifiant le développement tumoral. Elle donnerait également une réponse partielle quant au contrôle de l'orientation de l'axe de division par le microenvironnement tumoral. Ce dernier subit d'importantes modifications tissulaires et mécaniques. Puisque l'orientation de l'axe de division est partiellement contrôlée par ses paramètres, il est fort probable que les changements du microenvironnement tumoral participent aussi à la modification de l'orientation du fuseau mitotique et à une orientation de l'axe de division différent de celui établi dans les tissus sains. Ainsi, l'organisation de la tumeur en expansion

dans un environnement confiné pourrait induire une orientation préférentielle de l'axe de division pour maintenir une cohésion tissulaire de la tumeur primaire, alors que les cellules tumorales qui envahissent un tissu mou de façon individuelle ou collective pourraient se diviser sans orientation prédéfinie afin d'élargir la zone envahie. Si le microenvironnement tumoral affecte lui-même l'orientation de l'axe de division des cellules de la tumeur, il serait d'autant plus envisageable que ces défauts participent au développement tumoral, et il serait alors intéressant de pouvoir les cibler pharmacologiquement.

PARTIE 5 :

ETUDE DE L'IMPACT DES CONTRAINTES MECANIQUES SUR L'ACHEVEMENT DE LA MITOSE AU SEIN DES SPHEROIDES

L'analyse du déroulement des mitoses des sphéroïdes contrôles et traités avec les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine a révélé un effet des traitements sur l'achèvement des mitoses, absent dans les sphéroïdes contraints et traités.

1) Analyse de la fidélité des divisions

L'analyse des acquisitions des progressions en mitose dans les sphéroïdes non contraints, qu'ils soient traités à la Blebbistatine ou à la Latrunculine A, a révélé de forts pourcentages de divisions provenant de cellules apparemment binucléées, ainsi que de forts pourcentages de divisions multipolaires (principalement tripolaires) (**Figure 52A** et **Films 12 et 13** concernant les sphéroïdes contrôles traités à la Blebbistatine, et **Figure 52B** et **Films 14 et 15** concernant les sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A). Les divisions provenant de cellules binucléées commencent par la condensation de deux noyaux juxtaposés, par leur fusion avant de subir le remodelage de l'organisation des chromosomes pour tenter de mettre en place une plaque métaphasique. 2/3 des divisions provenant de la fusion de deux noyaux résultent en divisions multipolaires. A ce nombre s'ajoutent de nombreuses divisions multipolaires provenant d'un seul noyau. Ce sont principalement des divisions tripolaires. Elles se différencient des divisions bipolaires par l'absence de mise en place d'une plaque métaphasique proche du disque, mais au contraire par l'arrangement des chromosomes sur trois plans d'orientation différentes et réunis au niveau d'une arrête commune. L'anaphase résulte en trois lots de chromosomes séparés. Au total, dans les sphéroïdes contrôles traités à la Blebbistatine, 12% des mitoses proviennent de cellules binucléées et 29 % des mitoses sont multipolaires, contre 2% dans chaque cas pour les mitoses des sphéroïdes contraints traités à la Blebbistatine (**Figure 53**). Dans les sphéroïdes contrôles traités à la Latrunculine A, ces pourcentages montent à 23 et 49% respectivement, contre 2 et 6% dans les sphéroïdes contraints traités à la Latrunculine A (**Figure 53**).

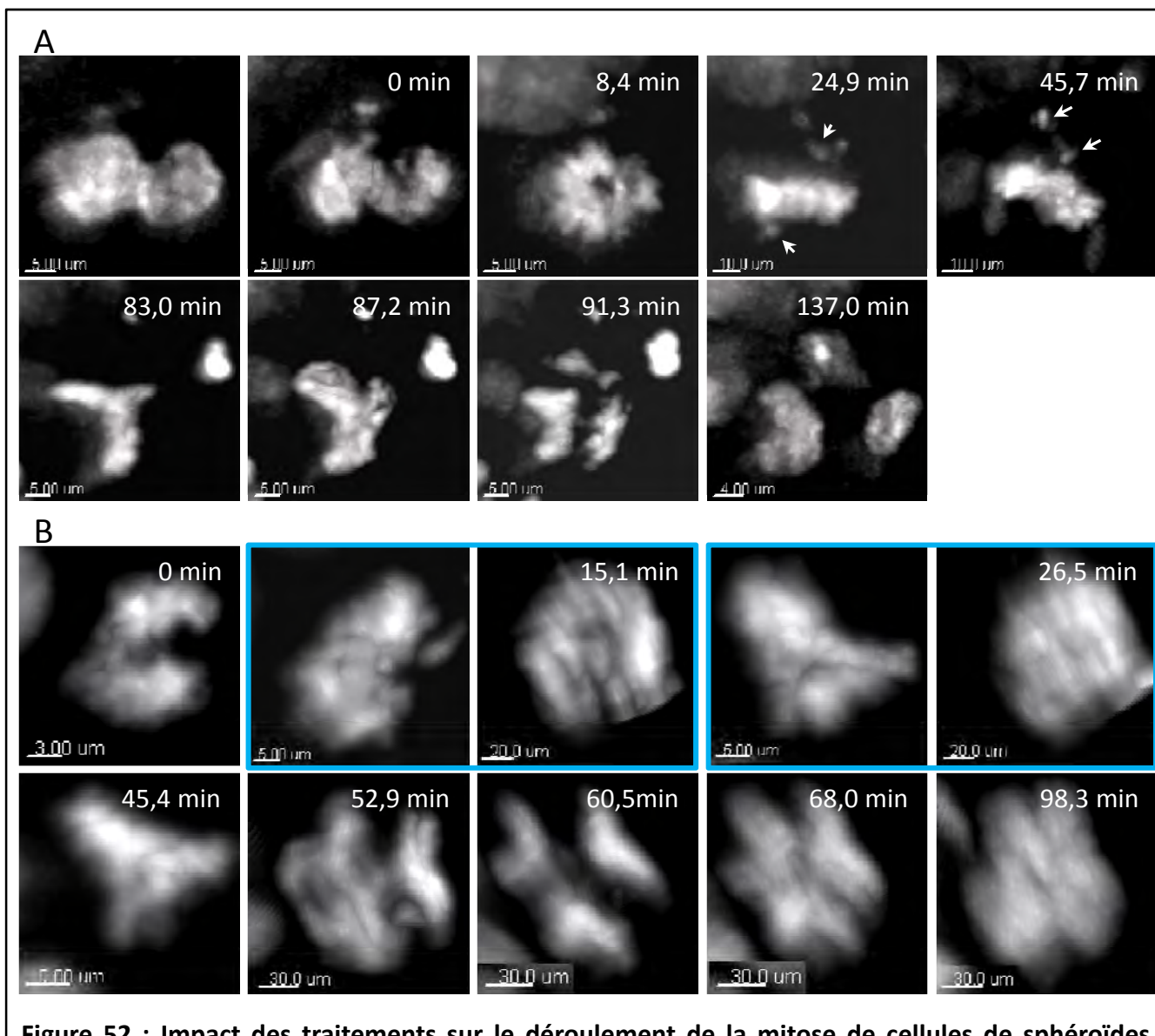
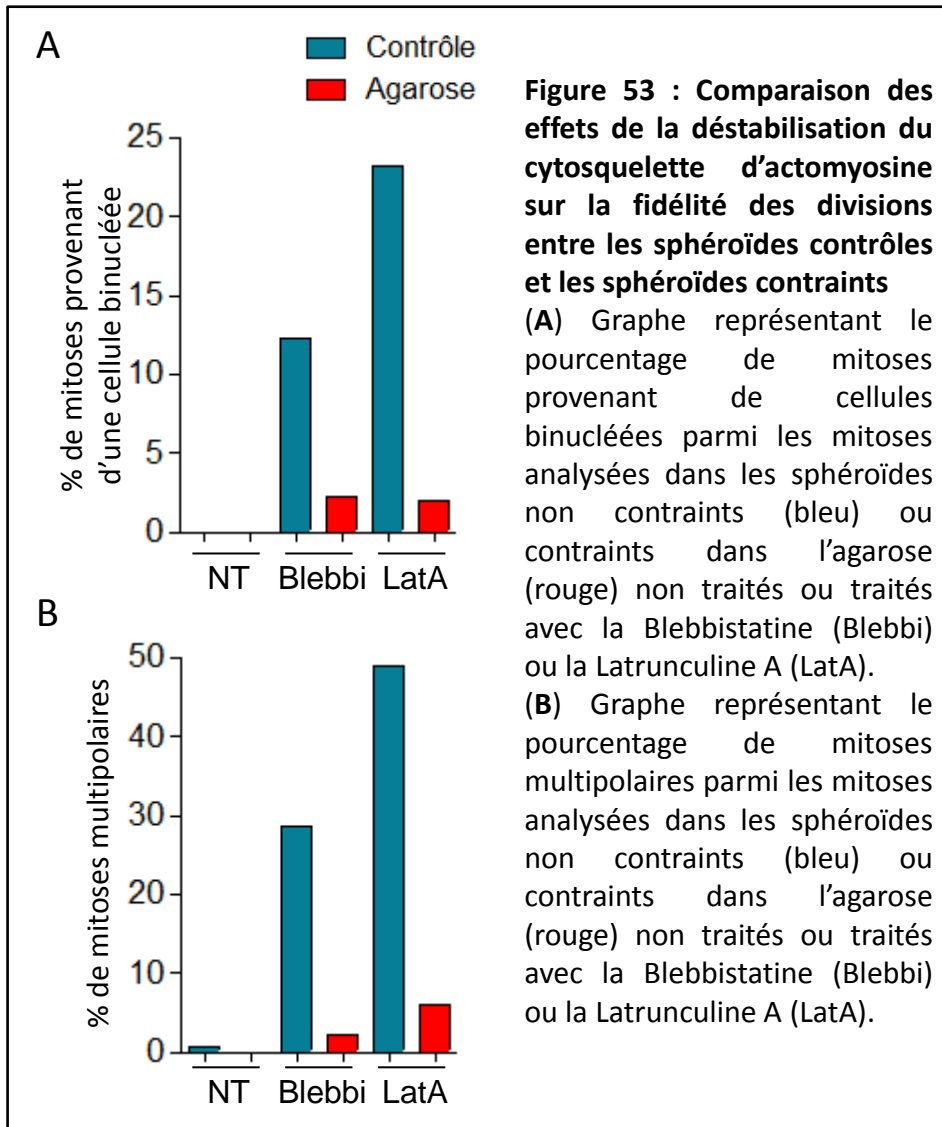


Figure 52 : Impact des traitements sur le déroulement de la mitose de cellules de sphéroïdes contrôles

(A) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde contrôlé traité à la Blebbistatine, en représentation 3D d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). Une rosace est visible à 8,4 minutes. La plaque métaphasique tente de s'établir mais on note la présence de chromosomes non alignés (flèches). Finalement, la cellule effectue une division tripolaire.

(B) Images de la progression en mitose d'une cellule d'un sphéroïde contrôlé traité à la Latrunculine A, en représentation 3D d'après une acquisition effectuée avec le SPIM. La durée représente le temps à partir de la condensation de l'ADN (0 min). La cellule effectue une division tripolaire, puis refusionne ses noyaux. Les images encadrées en bleue correspondent à la cellule au même temps, mais selon un angle de vue différent.



En conclusion, ces résultats montrent que la contrainte mécanique réduit le pourcentage de divisions aberrantes résultant d'un défaut de cytokinèse induit par les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine. Il semblerait que la contrainte mécanique puisse avoir un effet protecteur sur le bon déroulement des mitoses.

Afin de vérifier cette hypothèse, il est d'abord nécessaire de comprendre comment les divisions s'accomplissent en présence d'un cytosquelette déstabilisé en condition contrôles. Ensuite, nous pourrions formuler des hypothèses de correction des défauts de progression en mitose induit par la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine, par la contrainte mécanique. Pour finir, la confirmation ou l'infirmerie de ces hypothèses permettrait de préciser les mécanismes indépendants du cytosquelette d'actomyosine mis en jeu dans le déroulement des mitoses sous l'effet des contraintes.

2) Discussion

a) Les divisions anormales résultent de l'inhibition de la cytokinèse par les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine

La Blebbistatine et la Latrunculine A sont deux drogues qui inhibent la cytokinèse [212, 220]. La myosine II nécessaire à l'ingression du sillon de clivage fait coulisser, les uns par rapport aux autres, les filaments d'actine attachés à la membrane. Pourtant, la Blebbistatine n'empêche par la mise en place de l'anneau contractile. L'actine et la myosine se localisent correctement sur le plan équatorial, et les microtubules persistent sous forme d'un fuseau central ; seule la contraction de l'anneau est inhibée. Il semblerait également que l'inhibition de la myosine II par la Blebbistatine stabiliserait les filaments d'actine, ce qui réduirait aussi la dynamique des filaments nécessaire à la cytokinèse. De même, au-delà d'un certain temps sans évolution vers la cytokinèse, la sortie de mitose s'effectue. Les chromosomes se décondensent et les enveloppes nucléaires se forment. Celle-ci n'est inhibée ni par la Blebbistatine, ni par la Latrunculine A.

Les défauts de cytokinèse induit par les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine sont probablement responsables de la présence de cellules binucléées au sein des sphéroïdes traités. Il a été démontré que des cellules possédant un défaut de phosphorylation de la myosine II ne sont pas capables de faire aboutir leur cytokinèse,

deviennent des cellules binucléées et leur division suivante aboutit, dans 90% des cas, à une division multipolaire [221, 222]. Les divisions multipolaires et/ou provenant de cellules binucléées observées dans les sphéroïdes contrôles traités Blebbistatine et Latrunculine A résultent probablement d'un défaut de cytokinèse à la mitose précédant celle observée. Les résultats montrent que les pourcentages de ces divisions anormales sont très faibles en conditions contraintes. Ils sont diminués par 6 à 14 selon le traitement utilisé. Ils suggèrent qu'un mécanisme indépendant du cytosquelette d'actomyosine est activé sous l'effet de la contrainte mécanique pour réduire le nombre de divisions multipolaires et de divisions provenant de cellules binucléées. Plusieurs hypothèses de ce mécanisme sont possibles :

- La contrainte mécanique permet l'achèvement de la cytokinèse par un mécanisme indépendant du cytosquelette d'actomyosine
- La contrainte mécanique protège partiellement de l'action des drogues pour permettre au cytosquelette d'actomyosine d'achever la cytokinèse
- La contrainte mécanique facilite la fusion des noyaux et le regroupement des centrosomes surnuméraires pour réduire le nombre de cellules binucléées et les divisions multipolaires
- La contrainte mécanique ne restaure pas la cytokinèse mais prévient l'entrée en mitose des cellules binucléées, soit par un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, soit par une mise en quiescence des cellules binucléées.

Ces hypothèses sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

b) Arguments soutenant l'existence d'un processus de cytokinèse dans les sphéroïdes contraints traités

i. Les autres modes de cytokinèse dans le monde vivant

Il existe des mécanismes de cytokinèse différents de celui décrit dans les cellules animales, et certains d'entre eux sont indépendants du cytosquelette d'actomyosine (**Figure 54**, [223]). Les bactéries se divisent selon un mode proche de celui des cellules animales, mettant en jeu un anneau contractile constitué d'une protéine FtsZ, qui se rapproche sur le plan de la structure de la tubuline animale et non de l'actine.

Les plantes possèdent une paroi cellulaire rigide et n'utilisent pas un mécanisme d'anneau contractile pour se diviser. La cytokinèse se réalise par la construction d'une nouvelle paroi

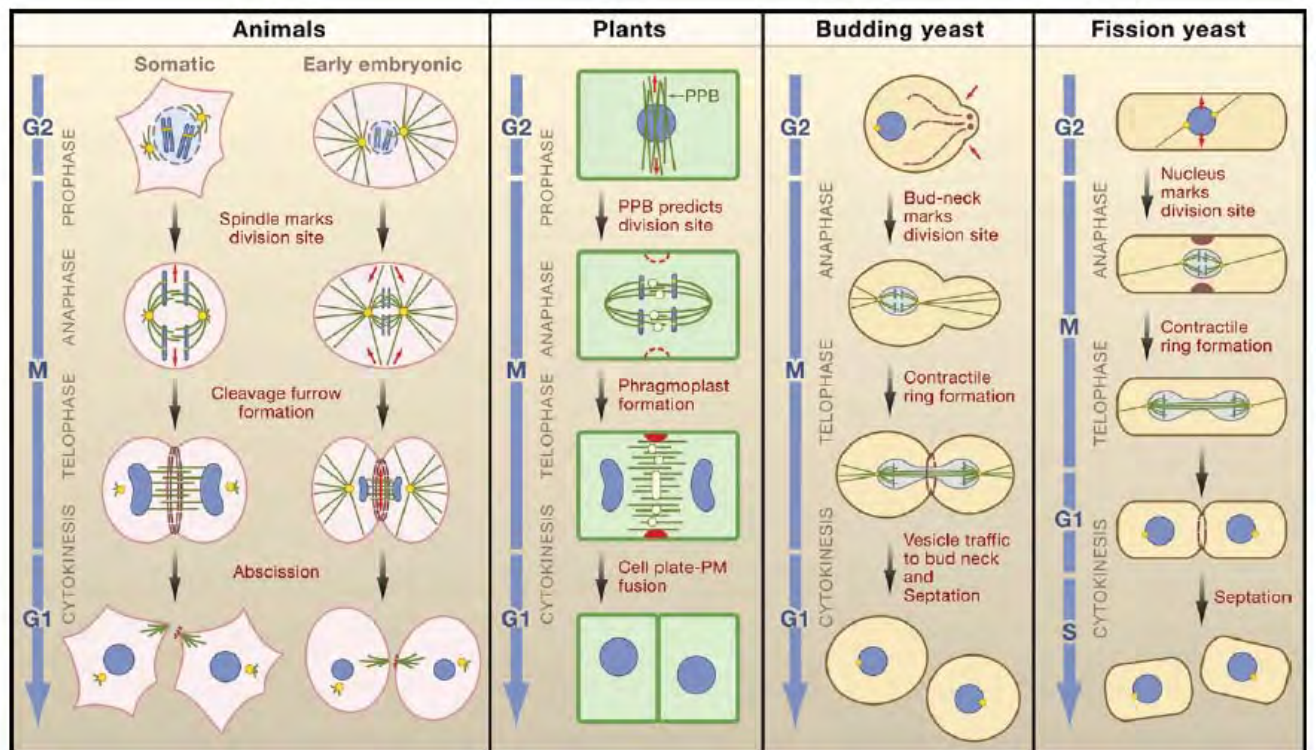


Figure 54 : La cytokinèse chez les animaux, les plantes, et les levures

Schéma représentant les différent types de cytokinèse entre les cellules animales, les plantes et les levures. Les chromosomes sont représentés en bleu, les kinétores et les centrosomes en jaune, les microtubules en vert et l'anneau contractile d'actine en marron. Cette figure est tirée de la publication de Bar *et al.* (2007).

La cytokinèse chez les animaux se déroule telle que je l'ai décrite en l'introduction générale. Un anneau d'actine se forme au niveau du plan de clivage, et régresse grâce à l'action de l'actine, jusqu'à ce que la machinerie d'abscission prenne le relai pour la séparation physique des deux cellules. Chez les plantes, l'accumulation et la fusion de vésicules au niveau du plan de clivage permet la séparation des deux cellules filles. Chez les levures, la séparation est menée par un anneau contractile d'actine.

entre les deux cellules filles. Des vésicules golgiennes contenant des matériaux de la paroi cellulaire s'accumulent au niveau de l'équateur, fusionnent puis se raccordent à la paroi de la cellule mère. Les deux cellules filles sont ainsi séparées et reconstituent leur paroi cellulaire rigide.

Les levures à fission possèdent également un mécanisme de cytokinèse qui présente quelques similitudes avec celui des cellules animales. Un anneau d'actine et de myosine se localise sur le plan équatorial de division et se contracte partiellement. Ensuite intervient la synthèse locale de membrane pour former la cloison entre les deux cellules.

Les modes de cytokinèse ont probablement changé avec l'évolution des espèces. Des mécanismes relativement variés existent maintenant dans le monde vivant. Il n'est pas impossible que les cellules aient gardé la possibilité d'achever leur cytokinèse selon un mode ancestral.

ii. Mécanismes de cytokinèse partiellement indépendant du cytosquelette d'actomyosine

Des travaux scientifiques supportent la possibilité d'un mécanisme de cytokinèse indépendant du cytosquelette d'actine chez les cellules eucaryotes, qui serait activé sous l'effet de contraintes mécaniques.

Le *Dictyostelium discoideum* possède au moins deux mécanismes redondants de cytokinèse [224, 225]. Le premier correspond, à peu de choses près, à celui de la constriction actomyosine-dépendante. Le second est un clivage dépendant de l'adhésion cellulaire. Neujahr *et al.* [226], ont montré que des *Dictyosteliums* déficients en myosine II étaient capables de subir la cytokinèse lorsqu'ils adhéraient à un substrat rigide. D'un point de vue morphologique, les mutants subissent les mêmes modifications de forme que les *Dictyostelium* sauvages, mais ne présentent pas d'anneau contractile d'actine au niveau du sillon de clivage. L'actine forme un cortex superficiel et s'épaissit légèrement au niveau des protrusions cellulaires en contact avec le substrat. Il semblerait que l'actine accumulée soit suffisante pour participer à ce mode de cytokinèse. Ce phénomène est considéré comme une forme de cytokinèse car il est corrélé temporellement avec la mitose et la présence d'un fuseau et d'asters, qu'il ne s'accompagne pas d'un allongement de la cellule associé à un

étirement du cytoplasme tel qu'il peut exister lors d'une cytofission. Le mouvement des centrosomes dans ces *Dictyostelium* mutants semble être guidé par la Dynéine se déplaçant le long de microtubules « guides » (différents de microtubules d'aster) qui sont raccrochés à la membrane plasmique ou au cortex d'actine [227].

Cette étude montre que la myosine II n'est pas essentielle à la cytokinèse des *Dictyosteliums*, si ceux-ci peuvent établir des contacts cellulaires. Il est possible que ce soit la traction que la cellule exprime sur le substrat par ses points d'ancrage qui lui permet cette forme de cytokinèse [228]. La myosine II servirait alors simplement à en accélérer la vitesse et à stabiliser les tensions internes.

Quelques études du déroulement de la cytokinèse en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé par la Latrunculine A ont également été menées chez les levures. Les levures à fission et à bourgeonnement semblent coupler la fonction de l'anneau contractile avec la synthèse locale de membrane pour former le septum entre les deux cellules. Bi *et al.* [229] montrent que la Latrunculine empêche la contraction de l'anneau contractile ainsi que le recrutement de la Septine pour la formation de la cloison cellulaire. Pourtant, la culture de certaines souches de levures mutantes pour l'homologue de la myosine (Myo1p) a révélé un mécanisme de séparation du bourgeon qui semble être indépendant du cytosquelette d'actomyosine. En traitant les levures avec de la Latrunculine A, c'est la Septine qui prend le relai précocement. Elle encercle le cou du bourgeon et induit la formation d'un complexe protéique qui va cibler les vésicules sécrétrices à la membrane pour la synthèse du septum. Des résultats similaires ont été mis en évidence chez le protozoaire *Tetrahymena* [230].

Une autre étude menée par Kunda *et al.* [217], supporte cette même hypothèse chez des cellules de *Drosophila*. Ils démontrent que la restauration de la tension de surface des cellules déplétées en moésine suffit à rétablir la mise en place d'un fuseau mitotique correct. Cette étude ne s'intéresse pas à la cytokinèse car la moésine, si elle contribue à la rigidité du sillon de clivage, n'est pourtant pas essentielle pour la cytokinèse. Dans ce cas, la diminution de rigidité ne semble pas affecter la cytokinèse. De plus, la Concanaviline A, utilisée pour restaurer la tension de surface des cellules, bloque la contractilité corticale [231], et ceci ne semble pas non plus avoir d'effet sur le déroulement de la mitose.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des cellules murines et humaines [232]. Des cellules NRK (*Normal Rat kidney Epithelial cells*), 3T3 ou HeLa ont été traitées avec un inhibiteur de Rho (C3 ribosyltransférase) qui agit sur la voie de signalisation de la myosine II. Cette dernière se retrouve distribuée de façon homogène sur l'ensemble des cellules traitées, l'actine ne se localise plus au niveau du sillon de clivage. Toutefois, plus de la moitié des NRK et la totalité des 3T3 sont capables d'achever la cytokinèse en présence de ce traitement. Les HeLa, peu adhérentes, n'y parviennent toutefois pas. Ces résultats révèlent à nouveau un mécanisme de cytokinèse différent selon l'état d'adhérence des cellules. Rho devient essentiel à la cytokinèse en absence de forces de traction établies grâce à l'adhésion. Par contre, même dans ces conditions, Rho reste nécessaire au contrôle spatio-temporel de la cytokinèse. O'Connell *et al.* [232] font l'hypothèse qu'un mécanisme moteur indépendant de Rho peut être impliqué dans le clivage de cellules adhérentes.

Ces résultats soulignent à nouveau l'importance du contrôle de la rigidité corticale, et le rôle compensatoire des ancrages cellulaires forts, pour faire progresser le sillon de clivage même en absence d'anneau contractile d'actine, et ce même dans des cellules humaines. Ces ancrages permettent peut-être à la cellule d'augmenter et de réguler sa rigidité corticale nécessaire à la cytokinèse. Matzke *et al.* [233] ont mesuré la rigidité corticale de cellules rénales de rat au cours de la cytokinèse par microscopie à force atomique (AFM). Ils observent une augmentation très importante de la rigidité corticale au niveau du sillon de clivage. Elle précède l'apparition du sillon de clivage, ce qui laisse penser qu'elle est nécessaire pour surmonter localement la tension corticale et créer le sillon de clivage. L'ajout de Blebbistatine [234] ou de Latrunculine A [220] au niveau du sillon ou au niveau des pôles a des effets différents, ce qui suppose que le cortex doit être compartimentalisé pour réguler localement sa rigidité [235]. Werner *et al.* [236] proposent qu'un paramètre de compartimentalisation pourrait être la distribution de la myosine II de façon dépendante des microtubules astraux. Les microtubules astraux réguleraient négativement la présence de myosine II aux pôles de la cellule. Un autre signal viendrait ensuite de la zone médiane du fuseau central, qui induirait la localisation de la myosine au niveau du plan de clivage pour induire l'ingression du sillon [237].

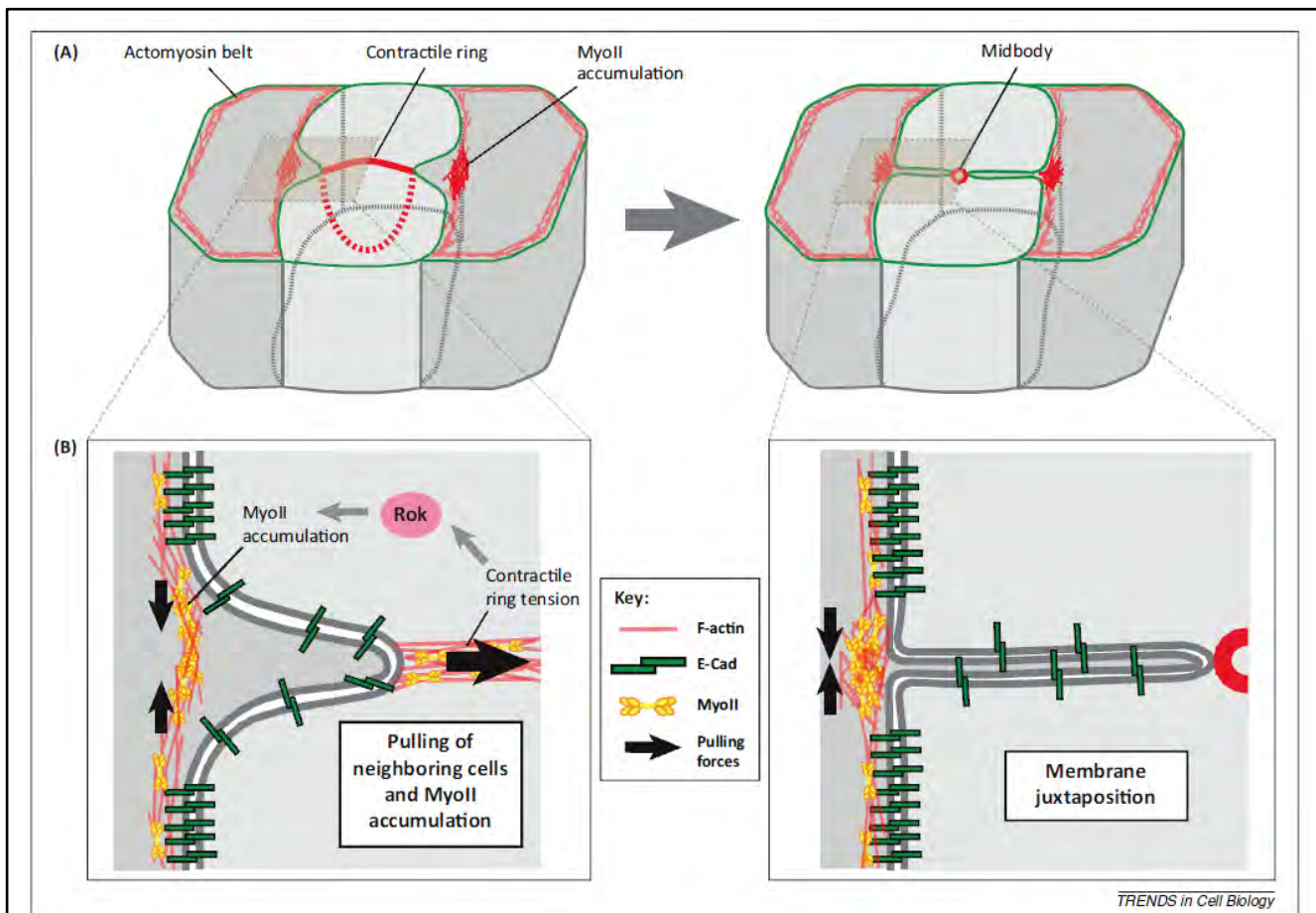


Figure 55 : Coordination entre les cellules pour l'achèvement de la cytokinèse dans un épithélium
(A) Schéma représentant une cellule en train d'effectuer sa cytokinèse, entourée de ses voisines au sein d'un épithélium. Les zones encadrées en **(A)** sont agrandies en **(B)**.

(B) A gauche : Au début de la rétraction du sillon de clivage, la tension de l'anneau contractile entraîne l'accumulation de myosine II (MyoII) dans la cellule voisine, au niveau du pont de part et d'autre du sillon. Cette accumulation de myosine II permet à la cellule voisine d'exercer une tension sur le sillon (flèches noires) qui va rapprocher les bords du sillon. Droite : Le rapprochement des bords du sillon rapproche les membranes des deux cellules filles. Ceci pourrait faciliter la formation de nouvelles jonctions intercellulaires entre les deux cellules filles. Cette figure est tirée de la publication de Herszterg *et al.* (2013).

Un autre paramètre important à prendre en compte est la multicellularité. Lorsque les cellules sont cultivées ensemble en 3 dimensions, la communication et les contacts intercellulaires prennent une importance négligée lors de cultures de cellules en deux dimensions. Le groupe de Y. Bellaïche [238] propose par ailleurs une vision multicellulaire de la cytokinèse dans les épithéliums, dans laquelle les cellules voisines participent activement au déroulement de la cytokinèse de la cellule en division (**Figure 55**). Au sein de ces tissus cohésifs et polarisés, la cellule en division doit à la fois exercer une force contractile et résister aux forces exercées par les cellules voisines. Il pense que ces forces induisent une accumulation de myosine II et d'actine au sein des cellules voisines au niveau du sillon de clivage, par perception des tensions de l'anneau contractile. La contraction de l'actine entraîne le rapprochement des deux cellules filles l'une contre l'autre en rapprochant les bords du sillon. Ce mécanisme faciliterait l'établissement de nouvelles jonctions intercellulaires tout en maintenant la cohésion tissulaire.

Pour conclure, l'ensemble de ces études montre qu'il existe plusieurs mécanismes de cytokinèses possibles, qui peuvent être redondants pour un même type cellulaire mais dont le choix dépendrait du modèle de culture. Elles prouvent également que les mécanismes cellulaires opérant dans des cellules cultivées en deux dimensions ne sont pas forcément présents, ou du moins majoritaires dans des conditions de cultures différentes. L'adhésion cellulaire, la tension corticale, l'état de confinement, la présence de drogues sont autant de paramètres pris en compte par la cellule. Il n'est donc pas exclu qu'un mécanisme de cytokinèse « alternatif » s'active dans des cellules animales confinées et ayant un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé. Ceci pourrait expliquer que les cellules des sphéroïdes contraints présentent si peu de défauts de divisions résultant d'un défaut de cytokinèse, malgré l'inhibition pharmacologique du cytosquelette d'actomyosine.

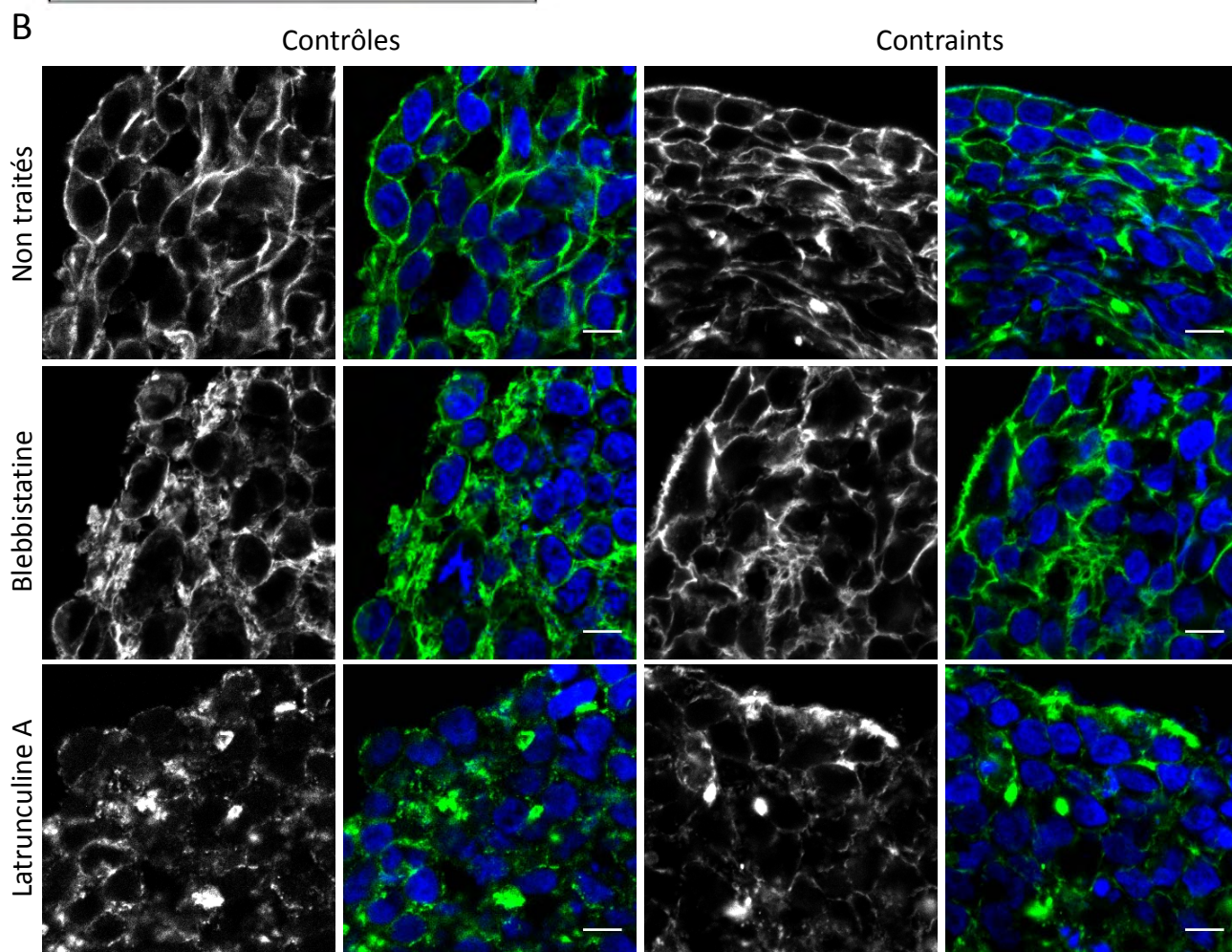
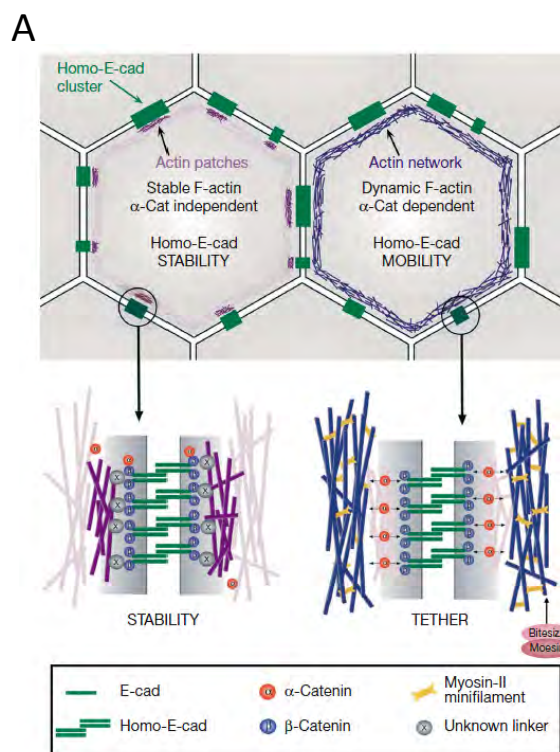
iii. Protection partielle de l'action des traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine par la contrainte mécanique

Le seul argument bibliographique qui supporte une protection partielle de l'effet des drogues par la contrainte mécanique provient des travaux de l'équipe de T. Lecuit [239]. Ils expliquent que l'inhibition des filaments d'actine par la Latrunculine A dans des épithéliums

Figure 56 : La contrainte mécanique semble partiellement protéger l'organisation des filaments d'actine contre les traitements

(A) Schéma représentant les deux populations d'actine qui régulent différemment les jonctions intercellulaires faisant intervenir la E-Cadhérine. Une population de F-actine petite et stable reste concentrée au niveau des jonctions intercellulaires, même en présence de Latrunculine A. Une autre population dynamique et contractile forme un large réseau cortical qui régule la distribution des jonctions intercellulaires. Cette figure est tirée de la publication de Cavey *et al.* (2008).

(B) Marquage des noyaux (DAPI, bleu) et de l'actine (Phalloïdine, vert) sur coupes à congélation de sphéroïdes contrôles et de sphéroïdes contraints dans l'agarose, non traités ou traités à la Blebbistatine ou à la Latrunculine A. La contrainte mécanique pourrait tendre à réduire légèrement les effets des traitements sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Barre d'échelle : 10µm.



d'embryons de *Drosophile* ne supprime pas l'accumulation de F-actine au niveau des jonctions adhérentes. Ils révèlent ainsi deux sous-populations de F-actine coexistantes : l'une petite et stable au niveau des jonctions adhérentes, l'autre plus large et dynamique (**Figure 56A**). Toutefois, la redistribution continue de ces jonctions est permise par une réorganisation de l'actine (dépendante de la dynamique d'assemblage et désassemblage des filaments, ainsi que de leur contractilité par la myosine II). Les plaques d'actine stable participeraient à la stabilité des jonctions adhérentes, l'actine corticale plus dynamique influencerait la régulation de la mobilité et de la redistribution de ces jonctions, ainsi qu'à la modulation de leur ancrage.

Il est possible que, dans les sphéroïdes, la régulation de ces deux populations de F-actine soit différente en condition contrôle et en condition contrainte. Par exemple, la compression pourrait induire une augmentation du nombre ou de la densité des jonctions intercellulaires constituées d'E-Cadhérine, et augmenter la proportion de F-actine stable à leur niveau. S'il y a une accumulation bien plus importante de jonctions intercellulaires et donc d'une actine stable et protégée contre la Latrunculine A dans les sphéroïdes contraints, il n'est pas impossible qu'elle puisse participer, au moins partiellement à des processus cellulaires tel que la cytokinèse. Il ne serait alors pas surprenant que l'inhibition de la myosine II n'ait également pas d'impact sur ce mécanisme dépendant de la F-actine stabilisée aux jonctions.

L'analyse de la distribution et l'organisation de l'actine sur coupes à congélation de sphéroïdes marquées à la Phalloïdine, semble révéler que la contrainte mécanique protège partiellement contre la désorganisation de l'actine induite par les différents traitements (**Figure 56B**). D'une part, la contrainte semble réduire l'accumulation d'actine dans ce qui paraît être des protrusions membranaires. Dans les sphéroïdes contrôles traités à la Blebbistatine, de larges zones riches en actine s'accumulent entre les noyaux. L'actine y semble organisée en tourbillons multidirectionnels. Le nombre et la taille de ces zones riches en actine semblent moindres dans les sphéroïdes sous contrainte mécanique traités à la Blebbistatine.

D'autre part, la contrainte préserverait partiellement l'actine de la déstabilisation par la Latrunculine A. Dans les sphéroïdes contrôles traités, l'actine corticale n'est quasiment plus discernable. Le marquage est très faible et punctiforme sur la majorité des contours

cellulaires. Pourtant, en certains points très localisés, l'actine s'accumule sans organisation apparente. En condition contrainte, les pourtours cellulaires sont légèrement plus discernables, et on retrouve quelques zones où l'actine ne serait pas tout à fait désorganisée, même si elle reste plus faible en quantité que dans les sphéroïdes non traités. D'ailleurs, Luxenburg *et al.* [240] montrent qu'à la concentration de 0,25µM, le cytosquelette d'actine est réduit mais pas totalement détruit. Il est possible qu'à la concentration que nous utilisons, 0,5µM, le cytosquelette d'actine ne soit pas suffisamment déstructuré pour induire les mêmes phénotypes observés dans les sphéroïdes contrôles.

c) Arguments soutenant une fusion des noyaux et un regroupement des centrosomes surnuméraires sous l'effet des contraintes mécaniques

Il est également envisageable que, sous l'effet des traitements, la cytokinèse n'ait pas davantage lieu dans les sphéroïdes contraints que dans les sphéroïdes contrôles, mais que les défauts de division qui en résultent soient masqués par d'autres phénomènes activés sous la contrainte mécanique uniquement. La fusion des noyaux des cellules n'ayant pas subi de cytokinèse pourrait expliquer le faible nombre de divisions provenant de cellules binucléées. Pourtant, les cellules auraient toujours un double contenu en ADN et en centrosomes, ce qui devrait conduire à des divisions multipolaires. Ces divisions multipolaires pourraient être limitées par un mécanisme de régulation des centrosomes : soit par inactivation ou expulsion des centrosomes surnuméraires, soit par regroupement des centrosomes en deux lots, un pour chaque pôle. Pour que l'association de ces deux mécanismes explique la différence de fidélité des mitoses observée entre les sphéroïdes contrôles et contraints, il faudrait qu'ils soient tous les deux induits par la contrainte mécanique. Il en résulte des cellules qui doubleraient leur contenu en ADN sans cytokinèse à chaque cycle, passant de 2 à 4, 8, 16 contenus en ADN et au-delà après 4 cycles. Si une autre régulation n'intervient pas, la tumeur ne serait alors composée que de cellules géantes, ce qui paraît peu pertinent par rapport aux données anatomopathologiques des tumeurs.

Par ailleurs, réunir à la fois deux mécanismes de régulation du déroulement de la mitose par la contrainte mécanique peut paraître excessif pour les capacités d'adaptation des cellules tumorales. Pourtant, concernant la fusion des noyaux, il n'est pas impossible que la compression et la modification des tensions des cellules induites par la croissance sous

contraintes mécaniques facilitent la fusion spontanée des noyaux. A titre d'exemple, Campinho *et al.* [241] observent la fusion de cellules au cours de la gastrulation du poisson zèbre lorsque celui-ci accumule trop de tension tissulaire. Il existe des mécanismes de contrôle de regroupement des centrosomes dans les cellules tumorales, qui seraient importants pour la survie des cellules cancéreuses. Si les cellules ne subissent que des divisions multipolaires, leurs capacités de survie avec un génome complètement aberrant s'amenuisent [242]. Sachant que la grande majorité des cancers contiennent des cellules possédant des centrosomes surnuméraires, il paraît nécessaire que la tumeur développe des mécanismes de contrôle des centrosomes afin de mener des divisions bipolaires normales.

Dans cet esprit, les travaux de l'équipe de M. Théry [243] apportent des arguments qui soutiennent le fait que le regroupement des centrosomes pourrait être contrôlé par les contraintes tissulaires. Par un criblage des gènes impliqués dans le regroupement des centrosomes, ils identifient que la contractilité et les forces dépendantes de l'actine participent au regroupement des centrosomes, qui est en partie contrôlé par la forme des cellules et la disposition de leurs sites d'adhésion. Ainsi, pour un même type cellulaire présentant des centrosomes surnuméraires, les cellules correctement étalées et allongées sur un substrat font davantage de divisions bipolaires que celles qui restent rondes en interphase. Les contraintes tissulaires sont dépendantes des contraintes mécaniques, et pourraient expliquer que le regroupement des centrosomes est plus efficace dans les sphéroïdes sous contrainte mécanique même en présence d'un cytosquelette déstabilisé.

De plus, il semblerait que les protéines du point de contrôle mitotique agissent de façon indirecte dans le regroupement des centrosomes. En effet, les divisions bipolaires résultant d'un regroupement des centrosomes présentent un délai pour l'établissement de la plaque métaphasique. L'activation du point de contrôle mitotique donnerait plus de temps aux cellules pour regrouper leurs centrosomes. Cette supposition corrèle avec nos observations, puisque les mitoses dans les sphéroïdes contraints présentent un allongement en prométaphase, qui résulterait de l'activation du point de contrôle mitotique jusqu'à ce que les centrosomes soient bien regroupés. Si cette hypothèse s'avère exacte, il resterait à comprendre comment le regroupement des centrosomes est permis dans les sphéroïdes contraints ayant un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé.

d) Arguments soutenant un contrôle de la progression dans le cycle, activé dans les sphéroïdes contraints

Il est possible que la contrainte mécanique ne participe pas à l'achèvement de la cytokinèse en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé, mais qu'il empêche la progression dans le cycle de cellules polynucléées ou polyploïdes. Il en résulterait toutefois une augmentation du nombre de cellules binucléées, ainsi que, à court terme, une diminution de l'index mitotique puis de la prolifération.

i. « Tetraploid checkpoint »

La présence de cellules polyploïdes et de divisions multipolaires nécessite la présentation rapide du point de contrôle tétraploïde.

Peu de choses sont connues au sujet du destin des cellules nouvellement tétraploïdes, et sur leur contrôle de progression dans le cycle cellulaire. Il a été proposé qu'un point de contrôle soit activé dans les cellules tétraploïdes, induisant leur arrêt immédiat en G1 [244]. Cependant, il a aussi été montré que la tétraploïdie n'empêche pas la progression de toutes les cellules dans le cycle [245-247], et que pour certaines lignées ou conditions de culture, c'est l'accumulation de défauts de ségrégation de chromosomes au cours des divisions triploïdes qui conduit à la réduction progressive des capacités prolifératives des cellules triploïdes par activation de p53 et arrêt en G1 [242]. La sortie de mitose par *mitotic slippage* conduit au même arrêt. Un défaut de cytokinèse ne s'accompagne pas forcément de défaut de ségrégation des chromosomes [222]. Ni la binucléation, ni le contenu doublé en centrosomes et en chromosomes qui en résulte n'activent un point de contrôle tétraploïde. Ainsi, seules les cellules polyploïdes ayant régulé leur nombre de centrosomes ou regroupé les centrosomes surnuméraires pour établir une division bipolaire continuent à proliférer.

Les divisions multipolaires observées dans les sphéroïdes traités sont probablement les premières divisions suivant le défaut de cytokinèse puisque le temps de traitement n'excède pas la durée de deux cycles cellulaires. Leur présence suggère que nos conditions de culture ne permettent pas l'activation du point de contrôle tétraploïde. D'autres part, l'arrêt de progression dans le cycle suite à des erreurs de division reste probablement faible au moment des acquisitions. Ceci n'explique toutefois pas ce qui peut se passer dans les sphéroïdes contraints traités pour que le taux de cellules binucléées entrant en mitose soit si

faible. Il est possible que dans ces conditions de contraintes, le point de contrôle tétraploïde soit actif.

ii. Arrêt en G1 suite à un délai en prométaphase

Le groupe de G. Sluder [248] a découvert un mécanisme d'arrêt en G1 qui pourrait expliquer un arrêt de prolifération des cellules binucléées ou polyploïdes dans les sphéroïdes contraints. Ils démontrent qu'un prolongement en prométaphase d'au moins une heure trente induit un arrêt en G1, chez les cellules humaines transformées (RPE1, *Retinal Pigment Epithelial cell line*). Cet arrêt est dépendant de l'activation transitoire de p53 puis de l'activation prolongée de p21 (jusqu'à 100h). Il n'est pas dépendant des dommages à l'ADN, ni de la résolution du point de contrôle mitotique, ni de la durée de la métaphase, ni de la mauvaise ségrégation des chromosomes. Il est dépendant de l'activation de la protéine p38. Cette kinase appartient à la famille des *mitogen-activated proteins kinases* (MAPKs) dont la voie de signalisation est activée en réponse à de nombreux stress cellulaires. L'activation de la voie p38-MAPK joue un rôle dans la différenciation cellulaire, l'inhibition de prolifération et l'apoptose [249, 250]. Son inhibition permet de contourner l'arrêt des cellules en G1. Si p38 est à nouveau activé après avoir contourné une première fois l'arrêt en G1, les cellules petites-filles s'arrêtent à leur tour en G1 en souvenir de l'allongement de la prométaphase de leur cellule grand-mère, et ce malgré une durée de prométaphase précédente normale.

Ce résultat est particulièrement intéressant, puisque la progression en mitose des cellules des sphéroïdes contraints est associée à un allongement des cellules en prométaphase. Il serait donc possible que la contrainte mécanique induise l'activation de la voie de p38 conduisant à un arrêt des cellules en G1, et ce, qu'elles aient ou pas achevé leur cytokinèse. L'arrêt des cellules en G1 ne nous permettrait plus d'analyser l'état mono- ou binucléé des cellules entamant une nouvelle division, ni si leur division est bi- ou tripolaire, ce qui masquerait l'achèvement correct de la cytokinèse à la mitose précédente. Cette hypothèse suggère que les divisions dont la prométaphase n'est pas allongée achèvent leur cytokinèse, ou du moins que celles qui ne l'ont pas achevées ont subi un allongement de prométaphase suffisant pour les conduire à s'arrêter en G1.

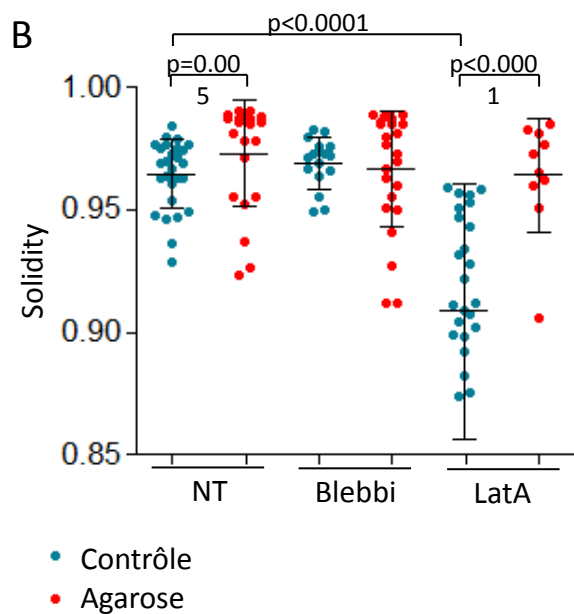
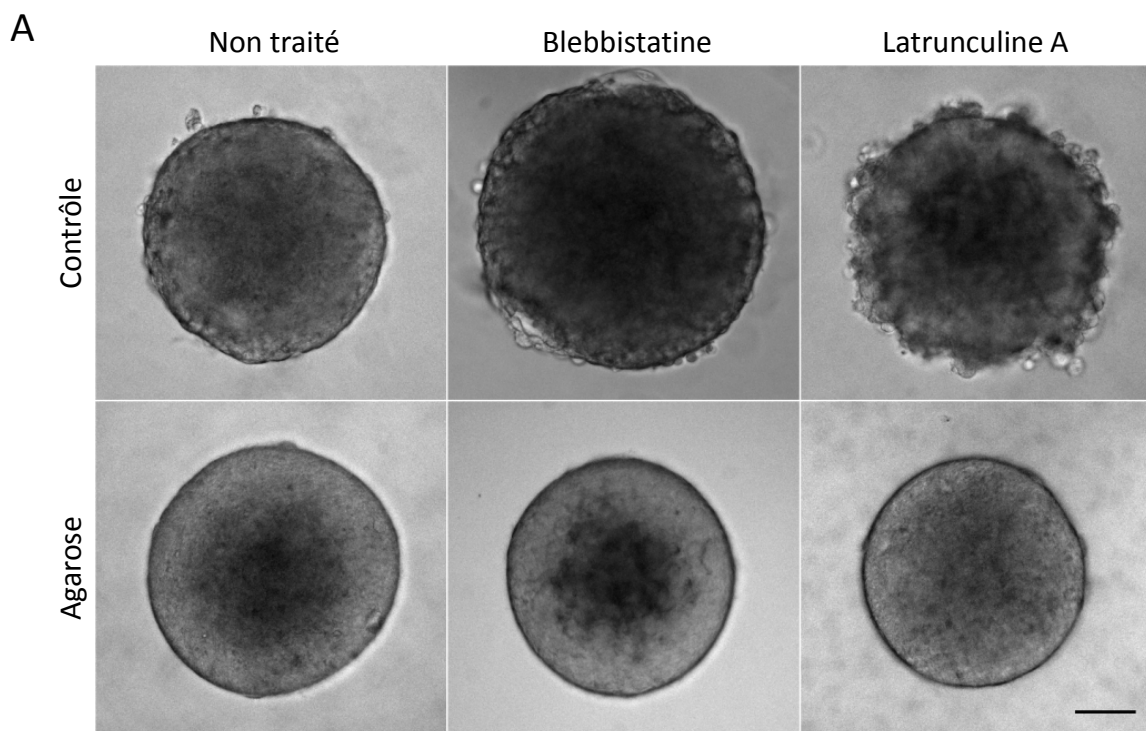


Figure 57 : Impact de la contrainte mécanique et des traitements sur l'aspect de surface des sphéroïdes

(A) Images en lumière transmise de sphéroïdes de 300µm de diamètre cultivés pendant 24h en condition contrôle et contrainte, non traitées, ou traitée Blebbistatine ou Latrunculine A. La perte de la régularité de surface des sphéroïdes traités Latrunculine est nettement visible. Tous les sphéroïdes contraints ont une surface très lisse et régulière. Barre d'échelle : 100µm.

(B) Graphe représentant les mesures de « solidity » extraite des images en lumière transmise de sphéroïdes de 300µm cultivés en suspension (Contrôle, bleu) ou contraints dans l'agarose (rouge), en présence (Blebbi ou LatA) ou en absence (NT) de traitement, pendant 20h. La *solidity* correspond au rapport de l'aire détectée sur la plus petite aire convexe qui lui correspond. La *solidity* représente l'inverse de la rugosité. Les barres d'erreur représentent la moyenne et sa déviation standard.

PARTIE 6 :

ETUDE DE L'IMPACT DE LA CONTRAINTE MECANIQUE SUR LES TENSIONS ET L'ORGANISATION CELLULAIRE AU SEIN DES SPHEROIDES

Nous avons montré que la contrainte mécanique induit un délai de progression en mitose, modifie l'orientation de l'axe de division des cellules et impacte la réponse aux inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine. Afin de mieux comprendre ces phénomènes au sein des sphéroïdes, nous avons étudié l'impact des contraintes mécaniques **sur les forces et sur l'organisation multicellulaire** qui existent au sein du sphéroïde. Cette partie présentera donc les résultats préliminaires obtenus à ce sujet.

1) Analyse de l'impact de la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine sur la tension de surface des sphéroïdes

La tension de surface d'un tissu est un paramètre qui reflète la cohésion intercellulaire, intégrant l'adhésion et la tension corticale des cellules constituant le tissu. Ce paramètre peut être étudié pour les sphéroïdes cultivés en suspension. Parmi les paramètres permettant d'apprécier la tension de surface d'un sphéroïde, nous avons utilisé celui de la régularité de contour des sphéroïdes [187]. Ce paramètre peut être déduit de l'évaluation d'une critère de rugosité, "solidity", de l'aire détectée à partir d'images en lumière transmise des sphéroïdes (**Figure 57**). Plus ce paramètre a une valeur proche de 1, plus la surface du sphéroïde est lisse et révèle une tension de surface importante. Cette analyse a été effectuée avec des sphéroïdes de 300µm de diamètre et cultivés en suspension, non traités ou traités Blebbistatine et Latrunculine pendant 20h.

L'analyse de l'aspect des sphéroïdes contrôles non traités en lumière transmise révèle qu'ils sont relativement sphériques, et que leur surface est régulière (*solidity* = 0,964 +/- 0,014, n=27, **Figure 57B**).

La tension de surface de sphéroïdes est dépendante de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine, comme il a été démontré par le groupe de J-P. Rieu [187]. Ce résultat n'est

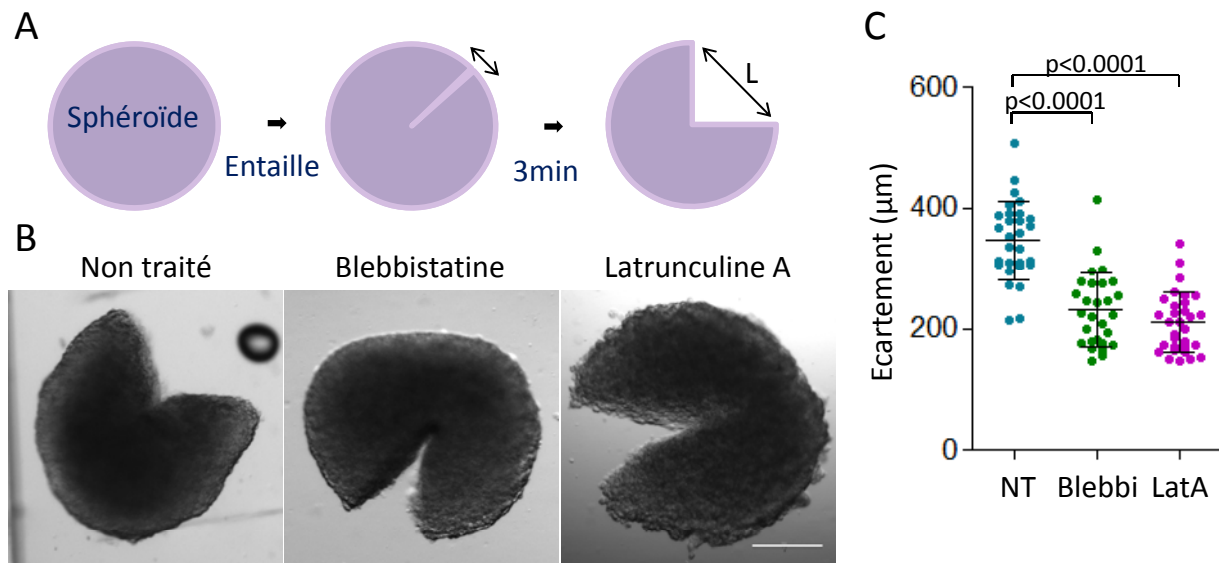


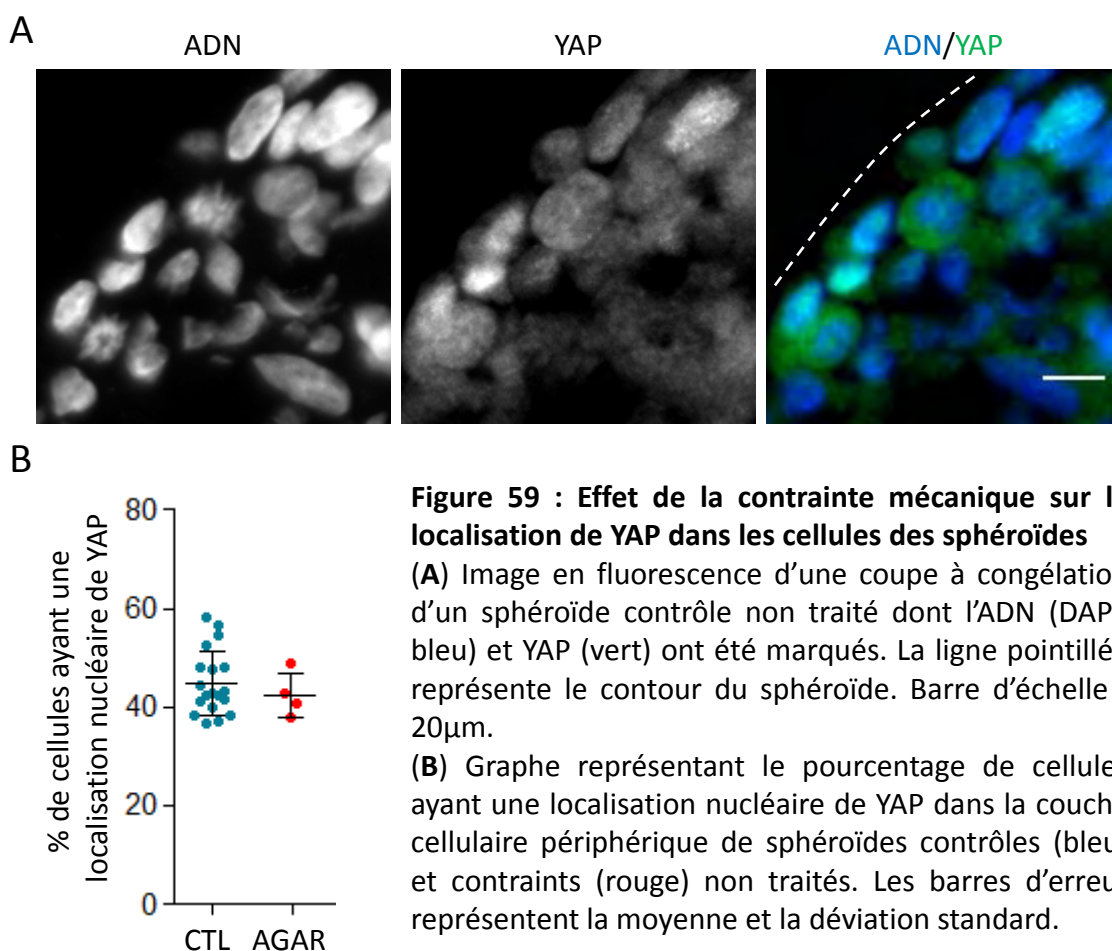
Figure 58 : Impact des traitements sur l'écartement des bords après incision des sphéroïdes
(A) Schéma représentant le sphéroïde avant (gauche), au moment (milieu) et 3 minutes après (droite) l'incision. La longueur des incisions est comprise entre 250 et 350 µm. L'incision induit un écartement des bords de longueur L qui a été comparé pour les différentes conditions 3 minutes après que l'entaille ait été réalisée.
(B) Images en lumière transmise d'un sphéroïde contrôle non traité (gauche), traité Blebbistatine (milieu) et traité Latrunculine A (droite) 3 minutes après l'incision. Barre d'échelle : 200 µm.
(C) Graphe représentant les valeurs d'écartement des bords (L) 3 minutes après incision de sphéroïdes contrôles non traités (NT, bleu), traité Blebbistatine (Blebbi, vert) et traités Latrunculine A (LatA, violet). Les barres d'erreur représentent la moyenne et la déviation standard.

pas reproduit dans notre étude à partir des mesure de rugosité sur les sphéroïdes contrôles traités Blebbistatine (*solidity* = 0,969 +/- 0,010, n=16, différence non significative avec la condition non traitée) (**Figure 57B**). Cependant, la rugosité des sphéroïdes contrôles est nettement augmentée par l'inhibition de l'assemblage des filaments d'actine par la Latrunculine A (*solidity* = 0,909 +/- 0,052, n=26, $p < 0,0001$ avec la situation contrôle non traitée) (**Figure 57B**). On devine des cellules qui se détachent presque du sphéroïde, et sa surface devient très irrégulière (**Figure 57A**). **En conclusion, ces résultats suggèrent que la tension de surface, et donc la cohésion cellulaire, sont diminuées par l'inhibition du cytosquelette d'actomyosine.**

Notre méthode d'étude ne révèle pas d'effet de l'inhibition de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine sur la tension de surface des sphéroïdes. Nous avons donc voulu vérifier l'impact de l'inhibition du cytosquelette d'actomyosine sur le stress solide accumulé au cours de la croissance des sphéroïdes. De la même façon que dans le modèle d'incision de tumeur de R.K. Jain [39], l'incision de sphéroïdes et la mesure de l'écartement des bords de l'entaille peut permettre de mettre en évidence des différences de ce stress selon les conditions de croissance. L'ouverture des sphéroïdes après incision reflète alors la tension circonférentielle de périphérie.

Les sphéroïdes contrôles non traités, traités Blebbistatine et traités Latrunculine A ont été incisés sur 35 à 50% du diamètre du sphéroïde, et l'écartement des bords de l'entaille a été mesuré 3 minutes après l'incision (**Figure 58**). Les sphéroïdes contrôles s'ouvrent de 347µm en moyenne (+/- 65µm, n=29). Les sphéroïdes traités Blebbistatine et Latrunculine A s'ouvrent seulement de 232µm (+/- 61µm, n=28, $p < 0,0001$ avec la situation contrôle) et de 210 µm (+/- 49µm, n=31, $p < 0,0001$ avec la situation contrôle) respectivement. Ces résultats montrent que l'inhibition du cytosquelette d'actomyosine réduit la tension circonférentielle de périphérie accumulée dans les sphéroïdes.

Ainsi, le cytosquelette d'actomyosine participe à la maintenance de la tension de surface des sphéroïdes, résultat possible d'une accumulation de stress solide induit par la croissance à l'intérieur des sphéroïdes.



2) Analyse de l'impact de la contrainte mécanique que l'organisation des tensions au sein des sphéroïdes

Concernant les sphéroïdes contraints, la présence d'agarose autour des sphéroïdes ne permet pas d'étudier la tension de surface. Nous avons tout de même analysé l'aspect de la surface des sphéroïdes par mesure de la *solidity* (**Figure 57B**).

Quelque soit la condition de traitement, la croissance des sphéroïdes dans l'agarose les rend davantage circulaires, avec une surface plus lisse et régulière (*solidity* = 0,973 +/- 0,022, n=22, p=0,0052 par rapport à la situation contrôle pour les sphéroïdes contraints non traités, *solidity* = 0,967 +/- 0,024, n=24, et 0,964 +/- 0,023, n=10, pour les sphéroïdes contraints traités Blebbistatine et traités Latrunculine respectivement). Ainsi, les sphéroïdes contraints en agarose dont le cytosquelette d'actomyosine a été déstabilisé ne présentent pas de différences de rugosité comparativement aux sphéroïdes contraints non traités : leur surface est parfaitement lisse et régulière.

Ces observation démontrent que la contrainte mécanique induit une augmentation de la régularité de surface des sphéroïdes, indépendamment de l'inhibition pharmacologique du cytosquelette d'actomyosine.

Afin de compléter ces observations, une analyse de la localisation nucléaire de YAP a été effectuée. La localisation nucléaire de YAP/TAZ permet de détecter les cellules qui possèdent un cytosquelette d'actomyosine sous tension [102, 103]. Afin d'étudier la tension cellulaire à la périphérie des sphéroïdes en suspension et en réponse à la contrainte mécanique, le pourcentage de cellules dans lesquelles YAP est détecté dans le noyau a été analysé dans la couche cellulaire périphérique des sphéroïdes contrôles et contraints (**Figure 59B**). En moyenne, 45% (+/- 7%, n=19) des cellules de la couche périphérique ont une localisation nucléaire de YAP dans les sphéroïdes contrôles. Ce pourcentage est inchangé dans les sphéroïdes contraints (42% +/- 5%, n=4).

Ce résultat signifie que la contrainte mécanique ne modifie pas le taux de localisation nucléaire de YAP des cellules de la couche.

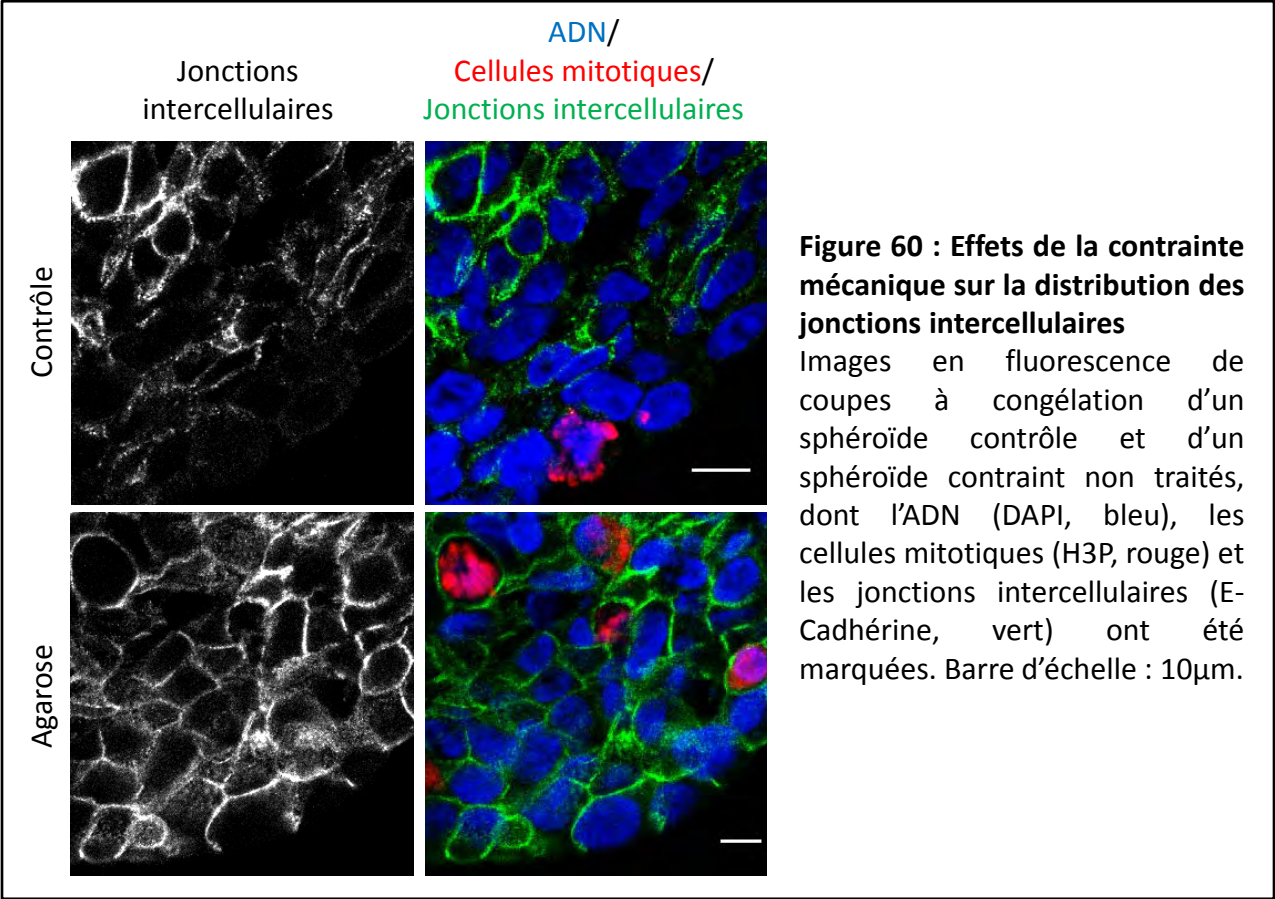


Figure 60 : Effets de la contrainte mécanique sur la distribution des jonctions intercellulaires
Images en fluorescence de coupes à congélation d'un sphéroïde contrôle et d'un sphéroïde contraint non traités, dont l'ADN (DAPI, bleu), les cellules mitotiques (H3P, rouge) et les jonctions intercellulaires (E-Cadhérine, vert) ont été marquées. Barre d'échelle : 10µm.

3) Analyse de la topologie tissulaire des sphéroïdes

Comme conclu à la fin de la partie 4, la corrélation des résultats obtenus avec l'organisation multicellulaire des sphéroïdes est nécessaire pour mieux comprendre l'implication de l'organisation cellulaire au sein des sphéroïdes dans la progression en mitose. Les résultats présentés ci-dessous sont préliminaires.

a) Analyse de la distribution des jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes

La détection de la E-Cadhérine sur coupes à congélation de sphéroïdes permet d'identifier la distribution des jonctions intercellulaires au sein des sphéroïdes (**Figure 60**). L'observation de ces coupes semble révéler que les cellules en périphérie dans les sphéroïdes contrôles possèdent moins de jonctions intercellulaires contenant de la E-Cadhérine que les cellules plus en profondeur dans le sphéroïde. Cependant, dans les sphéroïdes contraints, les couches cellulaires les plus périphériques semblent posséder des jonctions intercellulaires révélées par une présence d'E-Cadhérine très nette. Il est possible que la contrainte mécanique augmente l'expression et/ou la localisation membranaire d'E-Cadhérine, induisant la formation ou le renforcement des jonctions intercellulaires en périphérie des sphéroïdes, ce qui contribuerait à l'augmentation de la cohésion cellulaire des sphéroïdes. Ces observations doivent être confirmées par des analyses précises et reproductibles pour comparer la présence d'E-Cadhérine dans les sphéroïdes selon les différentes conditions de culture.

b) Analyse de l'organisation des noyaux au sein des sphéroïdes

La forme des noyaux dans les cellules peut-être dépendante de la forme des cellules, et des tensions subies par la cellule [93]. Le rapport noyau/cytoplasme étant élevé au sein des sphéroïdes HCT116, nous avons décidé d'analyser l'organisation multicellulaire des sphéroïdes en étudiant l'organisation des noyaux. L'orientation moyenne des noyaux par rapport à la normale à la surface et en fonction de la distance à la surface a été déterminée à partir de coupes à congélation de sphéroïdes cultivés selon les six conditions de culture (**Figure 61**). Cette analyse a été effectuées avec un programme Matlab développé par l'équipe PRIMO, de l'ITAV (Toulouse), à partir de coupes à congélation de sphéroïdes dont

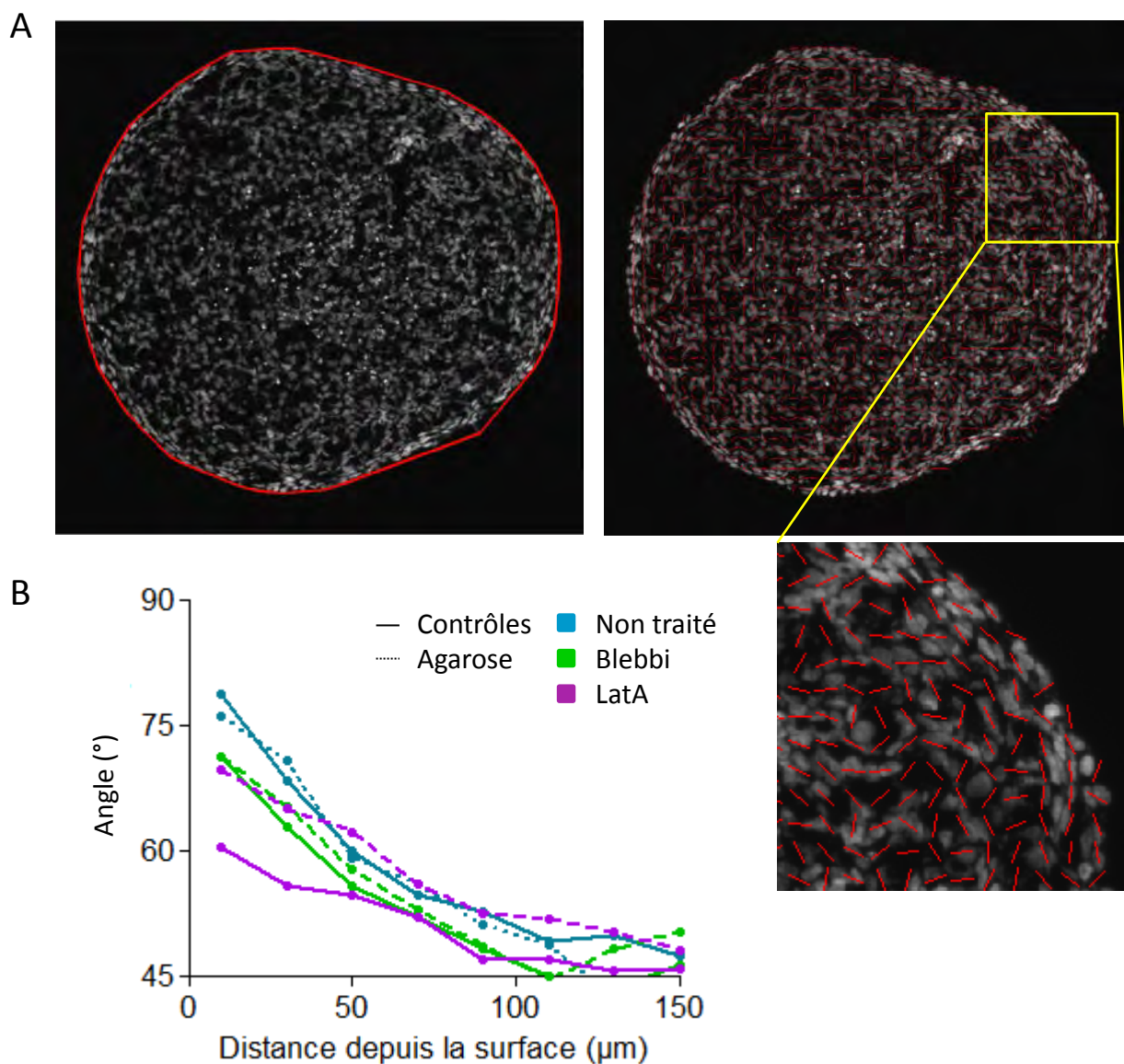


Figure 61 : Impact des contraintes mécaniques et des traitements sur l'organisation des noyaux

(A) Coupe à congélation d'un sphéroïde contrôle non traité dont l'organisation des noyaux a été analysée par l'algorithme Matlab développé par l'équipe PRIMO de l'ITAV (Toulouse). Le contour du sphéroïde est correctement détecté (à gauche), et les vecteurs d'orientation sont définis selon le marquage des noyaux (DAPI) sur la surface entière du sphéroïde (droite). La zone encadrée est agrandie en dessous.

(B) Graphe représentant les angles d'orientation moyens des tenseurs détectés à partir du signal de fluorescence des noyaux des sphéroïdes contrôles (traits pleins) et des sphéroïdes contraints (trait discontinus), non traités (bleu), traité Blebbistatine (vert) ou traités Latrunculine A (violet). Les traits des sphéroïdes contrôles et contraints non traités se superposent sur les 50 premiers microns.

les noyaux ont été marqués au DAPI. Brièvement, le programme analyse le signal de fluorescence localement sur toute la surface de la coupe de sphéroïde afin de déterminer des gradients d'intensité qui donneront des orientation des tenseurs d'organisation (**Figure S4**). Les orientations sont déterminées par rapport à la normale à la surface au point à la surface le plus proche, et en fonction de la distance à la surface (**Figure 61**). Ce programme ne cherche pas à segmenter les noyaux mais à étudier le sphéroïde comme un continuum.

Les résultats obtenus montrent que, dans les sphéroïdes contrôles et contraints non traités, les noyaux des couches périphériques prennent une orientation préférentiellement parallèle à la surface ($79^\circ \pm 4^\circ$, $n=9$, et $76^\circ \pm 7^\circ$, $n=6$, à $10\mu\text{m}$ de la surface pour les sphéroïdes contrôles et contraints non traités respectivement), qui diminue très rapidement pour aboutir à une orientation d'environ à $53^\circ (\pm 3^\circ)$ par rapport à la surface dès $90\mu\text{m}$ de profondeur.

Le traitement à la Blebbistatine induit une légère diminution de cette orientation, que ce soit en condition contrôle ou en condition contrainte ($71^\circ \pm 4^\circ$, $n=12$, et $71^\circ \pm 5^\circ$, $n=10$, à $10\mu\text{m}$ de la surface pour les sphéroïdes contrôles et contraints traités Blebbistatine respectivement). La Latrunculine induit quant à elle une diminution nette de l'orientation préférentiellement parallèle à la surface du sphéroïde en condition contrôle ($60^\circ \pm 5^\circ$ à $10\mu\text{m}$ de la surface, $n=6$). Dans les sphéroïdes contraints traités Latrunculine, cette orientation est maintenue ($70^\circ \pm 5^\circ$ à $10\mu\text{m}$ de la surface, $n=11$) à hauteur des sphéroïdes traités Blebbistatine.

Ces résultats très préliminaires semblent indiquer que l'inhibition pharmacologique du cytosquelette d'actomyosine réduit l'orientation préférentielle des noyaux parallèlement à la surface des sphéroïdes, avec un effet plus fort de l'inhibition des filaments d'actine que de l'inhibition de la myosine II. La contrainte mécanique ne semble pas modifier cette orientation des noyaux dans les sphéroïdes non traités ou traités Blebbistatine, mais elle semble la maintenir dans les sphéroïdes traités la Latrunculine A.

En conclusion, la contrainte mécanique ne semble pas induire de modification d'organisation des sphéroïdes non traités, mais protège de la désorganisation des noyaux induite par l'inhibition des filaments d'actine.

4) Discussion

a) La contrainte mécanique augmente la cohésion cellulaire sans modifier l'organisation cellulaire au sein des sphéroïdes

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la contrainte mécanique ne semble modifier ni la localisation cellulaire de YAP, ni l'organisation des noyaux en périphérie, mais s'accompagne d'une petite augmentation de la régularité et de la circularité des sphéroïdes, ainsi que peut-être d'une augmentation de la présence d'E-Cadhérine dans les couches cellulaires périphériques. Ces modifications soulignent une augmentation de la cohésion cellulaire des sphéroïdes sous l'effet des contraintes mécaniques.

Il est étonnant de ne pas observer de différences de la localisation nucléaire de YAP dans la couche cellulaire périphérique entre les sphéroïdes contrôles et contraints. Cependant, sa localisation est régulée par de nombreuses voies de signalisation. L'équipe de S. Piccolo [103] et Raghunathan *et al.* [251] observent d'ailleurs une réponse inverse de l'activation de YAP à la rigidité du substrat. Effectivement, il n'est pas seulement régulé par la tension du cytosquelette d'actomyosine, mais est également inhibé par l'activation de la voie de signalisation Hippo. Il est possible que YAP soit aussi régulé par les jonctions intercellulaires, puisque la culture de cellules confluentes induit sa localisation cytoplasmique [103]. Dans les sphéroïdes contraints en agarose, les jonctions intercellulaires pourraient être augmentées en périphérie des sphéroïdes et induire une relocalisation cytoplasmique et l'inhibition de YAP.

La forme des cellules [142] et la distribution des jonctions cellules-cellules [141] participant à la détermination de l'orientation de l'axe de division, la modification de ces paramètres pourrait expliquer la déviation de l'orientation préférentielle de l'axe de division de 15° en condition contrainte par rapport à l'orientation préférentiellement observée dans les sphéroïdes contrôles. La disposition des noyaux pouvant être un reflet de la forme et de l'organisation des cellules, nous avons analysé l'organisation des noyaux dans les sphéroïdes. Cependant, les résultats obtenus ne montrent pas d'effet de la contrainte mécanique sur l'organisation des noyaux dans les sphéroïdes non traités. Ce résultat préliminaire suggère que la modification de l'axe préférentiel de division des cellules mitotiques ne soit pas

associée à une organisation différente des noyaux au sein des sphéroïdes. Elle trouverait peut-être son explication dans la distribution des jonctions intercellulaires. Selon un autre point de vue, la réorientation de l'axe de division par la contrainte mécanique permettrait de réguler les forces existantes au sein des sphéroïdes. En effet, Campinho *et al.* [241] démontrent que, dans un épithélium sous tension, le placement respectif des cellules filles, dépendant de l'orientation de l'axe de division, participe à la réduction de la tension du tissu. La croissance des sphéroïdes dans l'agarose est associée à des forces de compression et à une augmentation de la tension de surface. La force résultante que subit le tissu pourrait induire une réorientation de l'axe de division de quelques degrés ou dizaines de degrés par rapport à la situation contrôle (**Figure 62**), afin de réguler le déséquilibre des forces au sein du sphéroïde contraint.

Il est également possible que ces modifications s'accompagnent d'une distribution ou d'une dynamique de l'actine différente au sein des cellules des sphéroïdes contraints et qui serait responsable du délai en prométaphase.

b) La contrainte mécanique modifie l'effet des inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine sur les forces et l'organisation cellulaire des sphéroïdes

Nous avons montré qu'en croissance sous contrainte mécanique, les défauts de progression en mitose résultant d'un défaut de cytokinèse induit par les inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine sont absents. Or, nous avons observé que la contrainte mécanique maintient la tension de surface et une partie de l'organisation des noyaux modifiées par la Latrunculine A à des niveaux équivalents de ceux des sphéroïdes contrôles non traités. Or, Kunda *et al.* [217] montrent, sur cellules uniques, que la restauration de la tension corticale et de la rigidité de cellules déplétées en Moésine suffit à restaurer la mise en place du fuseau bipolaire. De façon similaire, le maintien de la tension de surface dans les sphéroïdes contraints dont le cytosquelette d'actomyosine a été déstabilisé pourrait maintenir une tension corticale nécessaire à la cytokinèse. D'un autre point de vue, cette augmentation de la tension de surface, parce qu'elle serait trop élevée, pourrait aussi être responsable du délai en prométaphase observé dans les sphéroïdes contraints. Cependant,

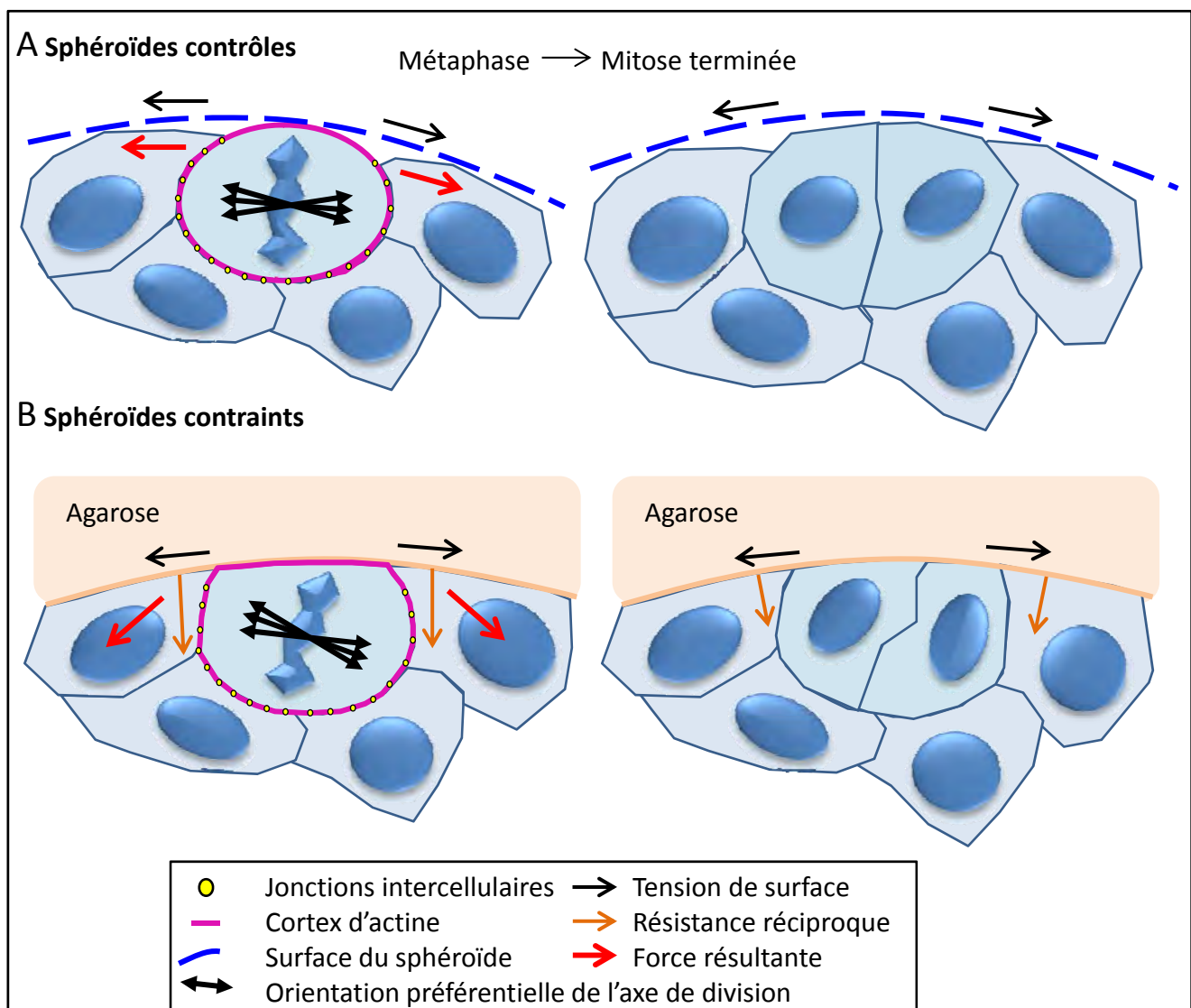


Figure 62 : Modèle de l'impact des contraintes mécaniques sur la régulation de l'orientation de l'axe de division

(A) Les forces présentes au sein d'un sphéroïde contrôle sont à l'équilibre. En surface, les forces de tension de surface (flèche noire à sens unique) sont majoritaires et induisent une orientation de l'axe de division parallèle à la surface. Il en résulte deux cellules filles localisées côte à côte le long de la surface du sphéroïde.

(B) Au sein des sphéroïdes contraints, la présence d'agarose induit l'apparition d'une force de résistance (flèche rouge). En s'ajoutant aux tensions de surface, cette force de résistance dévie légèrement la force résultante comparativement aux sphéroïdes contrôles. L'axe de division est alors légèrement décalé, et les cellules filles ne seront pas forcément localisées côte à côte le long de la surface du sphéroïde.

cette explication n'est pas entièrement satisfaisante concernant les effets de la Blebbistatine, puisque l'inhibition de la contractilité du cytosquelette d'actomyosine n'a qu'un effet sur l'accumulation de stress solide à l'intérieur des sphéroïdes et n'en a presque pas sur la tension de surface et sur l'organisation cellulaire. A nouveau, la distribution des jonctions intercellulaire pourrait expliquer la différence des phénotypes observée entre les sphéroïdes contrôles et contraints traités.

Le groupe de Y. Bellaïche [238] a souligné l'importance de la relation entre les jonctions intercellulaires et le cytosquelette d'actomyosine dans le déroulement de la cytokinèse au sein d'un tissu. En induisant une augmentation des jonctions intercellulaires constituées d'E-Cadhérine dans les sphéroïdes, la contrainte mécanique pourrait augmenter de façon semblable la population d'actine stable localisée au niveau de ces jonctions, et qui ne serait pas atteinte par la Latrunculine A [239]. Ces deux paramètres participent peut-être à la cytokinèse des cellules sous contrainte mécanique, ou à l'activation d'un autre mécanisme de régulation des mitoses aberrantes, malgré un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé. Il paraît important d'analyser la distribution des jonctions intercellulaires dans les sphéroïdes contrôle et contraints traités Blebbistatine et Latrunculine afin de vérifier cette hypothèse. Toutefois il est nécessaire d'être prudent, car la présence d'un marquage d'E-Cadhérine à la surface des cellules ne suffit pas à déterminer l'état d'activation de ces jonctions. Par exemple, la Blebbistatine induit la redistribution de la E-Cadhérine sur toute la surface de la cellule, sans tenir compte des jonctions d'adhésion [84]. Il en résulte une force d'adhésion des cellules fortement diminuée. Cette perte de l'adhésion induite par la Blebbistatine pourrait être contrebalancée par la contrainte mécanique. Il est également possible que la contrainte induise une régulation encore inconnue des jonctions intercellulaires qui participerait aux comportements cellulaires qui ont été observés dans les sphéroïdes contraints et traités. Par exemple, la connexion des microtubules aux Cadhérines apparaît comme étant un déterminant important de l'adhésion cellulaire, mais reste à ce jour encore méconnu [252, 253]. L'inhibition des microtubules avec du Nocodazole réduit l'accumulation des Cadhérines, des Caténines et de l'actine au niveau des jonctions adhérentes [254]. Les microtubules régulent également l'accumulation et l'activation de la myosine II au niveau des jonctions cellulaires, ce qui participe en retour à la mobilité des Cadhérines. Inversement, les liens homophiliques des Cadhérines à la membrane plasmique suffisent à

induire le recrutement des microtubules [255]. Le lien qui existe entre le cytosquelette d'actomyosine, les microtubules et les jonctions cellulaires est complexe, mais permettrait une régulation spécifique dépendante de l'état de la cellule et de son environnement. L'accumulation de jonctions intercellulaires riches en Cadherine dans les sphéroïdes contraints stabiliserait peut-être davantage les microtubules que dans les sphéroïdes contrôles, et permettrait l'activation de mécanismes cellulaires différents qui expliquerait les différences de progression en mitose observées.

DISCUSSION GENERALE ET PERPECTIVES

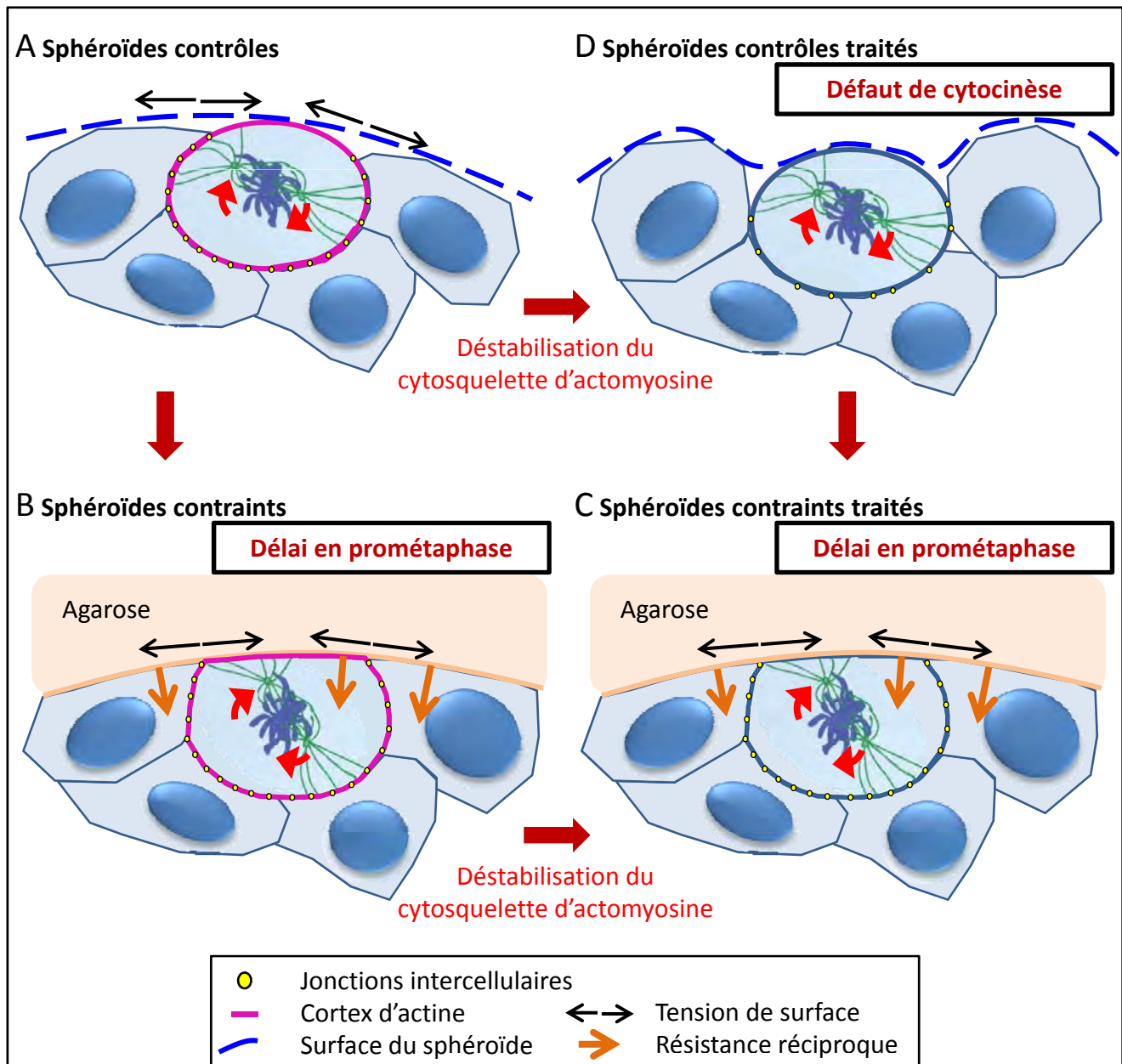


Figure 63 : Modèle de l'impact des contraintes mécaniques et de l'implication du cytosquelette d'actomyosine dans le déroulement de la mitose dans les sphéroïdes

(A) La croissance d'un sphéroïde en suspension s'accompagne d'un équilibre des forces existantes au sein du sphéroïde.

(B) La croissance d'un sphéroïde enrobé dans de l'agarose fait apparaître des forces de compression dû à la résistance réciproque de l'agarose. Ces forces participent probablement à la déstabilisation des forces intracellulaires, et par exemple à la dynamique du cytosquelette d'actomyosine, ce qui ralentit la mise en place du fuseau mitotique et induit un délai en prométophase.

(C) Le traitement des sphéroïdes contraints par des agents déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine n'entraîne pas d'effets supplémentaires sur la progression en mitose. Ceci suggère que la progression en mitose dans un environnement contraint peut se réaliser en absence d'un cytosquelette d'actomyosine.

(D) A l'inverse, le traitement des sphéroïdes contrôles par des agents déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine révèle des défauts de cytokinèse, qui conduisent à des divisions aberrantes. Ces traitements causent également une perte de la cohésion tissulaire et une redistribution des jonctions intercellulaires.

1) Régulation de la progression en mitose et de la réponse aux traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine dans les sphéroïdes contraints mécaniquement

Au terme de ce travail, nous proposons un modèle général dans lequel les contraintes tissulaires et mécaniques sont perçues par les cellules composant une tumeur ayant pour conséquence :

- De modifier le déroulement de la mitose ;
- De modifier la réponse aux traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine.

Au sein d'un sphéroïde en suspension (**Figure 63A**), un équilibre des forces est maintenu de façon à ce que le sphéroïde, au cours de sa croissance, maintienne une forme sphérique (qui représente un état d'énergie minimum). Dans ces conditions, les mitoses se déroulent correctement avec un enchaînement des différentes étapes régulier jusqu'à l'achèvement de la division. Le fuseau bipolaire se met en place une vingtaine de minutes après la condensation de l'ADN, l'axe de division est préférentiellement orienté parallèlement à la surface, et peu de divisions infidèles ont lieu.

La croissance des sphéroïdes dans un environnement confiné induit un défaut de progression en mitose (**Figure 63B**), probablement associé à un défaut de mise en place du fuseau bipolaire. Qu'il soit contraint entre deux murs de PDMS, ou enrobé dans de l'agarose, la croissance orientée et la rupture du gel sont des preuves d'un déséquilibre des forces au sein des sphéroïdes. Ce déséquilibre et la présence de forces de compression peuvent participer à ce défaut de progression en mitose. Dans les sphéroïdes contraints en agarose, ce défaut est lié à un défaut de mise en place du fuseau et conduit à un délai en prométaphase qui s'accompagne d'une légère rotation de l'orientation préférentielle de l'axe de division. Nous pensons que ce délai est causé par l'activation du point de contrôle mitotique. Toutefois, ce défaut n'est que transitoire, car la majorité des cellules progressent finalement en métaphase et anaphase, et semblent achever leur mitose normalement. Il reste toutefois possible que le point de contrôle mitotique ne soit pas complètement satisfait, et que les cellules soient capables de contourner le SAC et de progresser en mitose dès qu'un fuseau mitotique est mis en place.

La déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine dans les sphéroïdes contraints en agarose paraît n'avoir aucun effet sur la progression en mitose (**Figure 63C**). Le délai en prométaphase, l'orientation de l'axe de division et la fidélité des divisions sont équivalents à ceux observés dans les sphéroïdes contraints non traités. Même en présence des traitements, l'agarose semble permettre la conservation d'une cohésion cellulaire forte, qui s'exprime par une tension de surface maintenue et la persistance des jonctions intercellulaires. Cette conservation de l'organisation multicellulaire peut participer à l'absence d'effets visibles des traitements. La contrainte mécanique peut également participer à la protection des sphéroïdes contre les traitements. Il apparaît que la progression en mitose peut être permise même en présence d'un cytosquelette d'actomyosine déstabilisé. Cette observation suggère fortement l'implication d'un mécanisme alternatif capable de compenser l'altération du cytosquelette d'actomyosine dans l'établissement du fuseau mitotique et dans le contrôle de l'orientation de l'axe de division. L'absence d'accumulation de divisions infidèles est la preuve que des voies de signalisation spécifiques sont activées dans les sphéroïdes sous contrainte afin de réguler l'entrée ou le déroulement de la mitose pour réduire les divisions aberrantes.

La déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine dans des sphéroïdes en suspension induit un défaut de cytokinèse qui conduit à un fort pourcentage de divisions aberrantes (**Figure 63D**). Ces sphéroïdes traités ont une cohésion cellulaire moins importante, qui se traduit par une diminution de la tension circonférentielle radiale. Ces effets secondaires aux traitements pourraient être la cause principale du défaut de cytokinèse. Cependant, à nouveau, la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine ne semble pas impacter l'établissement et l'orientation du fuseau bipolaire, suggérant son rôle secondaire ou redondant avec un autre mécanisme cellulaire pour la mise en place d'un fuseau mitotique.

En conclusion, cette étude a mis en évidence un impact des contraintes mécaniques sur la progression en mitose, et révèle au moins un comportement cellulaire différent entre des conditions de culture en suspension et sous contrainte mécanique. Les résultats démontrent des réponses aux inhibiteurs pharmacologiques du cytosquelette d'actomyosine différentes entre ces deux conditions de culture.

Le modèle de sphéroïdes cultivés dans des conditions de contrainte reproduit l'environnement mécanique des microtumeurs. Il est envisageable que les comportements cellulaires induits par la contrainte mécanique révélés dans cette étude reproduisent ceux qui se développent sur les cellules tumorales *in vivo*. Ces comportements peuvent avoir des conséquences importantes dans le développement tumoral, et dans l'efficacité thérapeutique des traitements anticancéreux. Il est donc important de poursuivre ces travaux pour identifier les mécanismes de progression en mitose qui ont lieu dans les cellules des sphéroïdes contraints, car ils permettront de mieux comprendre le comportement des cellules tumorales *in vivo* dans leur propre environnement mécanique. Il est probable que les contraintes mécaniques ont un impact sur des voies de signalisation participant à d'autres phénomènes cellulaires, telles que la résistance à l'apoptose, ou l'invasion, et qu'il serait judicieux d'identifier.

2) Impact du microenvironnement tumoral sur le développement tumoral

a) *Devenir des cellules ayant un défaut de progression en mitose*

Les défauts de progression en mitose observés dans les deux modèles d'étude de croissance de sphéroïdes sous contrainte mécanique ne sont pas identiques, mais ils pourraient dépendre tous les deux de l'orientation et de l'amplitude des forces présentes au sein des sphéroïdes.

Il est possible que ce défaut de progression soit de plusieurs heures dans les sphéroïdes cultivés entre les murs de PDMS. Dans la littérature, des arrêts de quelques heures sont obtenus par traitement pharmacologique ou par manipulation génétique [256], mais conduisent tous à une sortie de mitose avant 24h. En effet, une cellule ne peut rester indéfiniment en mitose [257, 258] car son impossibilité à transcrire et traduire des protéines [259] la conduit inéluctablement à la sortie de mitose par deux mécanismes résultants de la dégradation des protéines. L'un est la dégradation de la Cycline B, qui conduit à une sortie de mitose avec décondensation de l'ADN sans division [260] et une progression en G1 ou G0. L'autre est la dégradation de la cohésine, qui maintient les chromatides sœurs entre-elles, induit la séparation asynchrone et incontrôlée des chromatides sœurs, qui s'accompagne d'une division en deux cellules filles qui ne seront pas identiques. Ce phénomène est décrit comme étant un *mitotic slippage*. Ces progressions anormales en mitose peuvent également

aboutir à la mort cellulaire, soit au cours de la mitose (catastrophe mitotique), soit par apoptose [261] après une sortie de mitose par l'un ou l'autre des mécanismes décrits ci-dessus.

Le marquage des cellules apoptotiques dans les sphéroïdes contraints ne révèle pas de mort cellulaire par apoptose. Il est possible que la mort cellulaire se manifeste sous une autre forme, ou bien qu'elle intervienne au delà d'une vingtaine d'heures de culture sous contrainte mécanique. Très probablement, tous les comportements cellulaires associés à des défauts de progression en mitose sont représentés dans les sphéroïdes contraints, car les lignées cellulaires possèdent une variation intralignée de réponse à un arrêt en mitose importante [258]. Une autre possibilité est que les cellules arrêtées en mitose par la contrainte mécanique sont protégées contre la dégradation de la Cycline B ou contre l'induction de la mort cellulaire, ce qui expliquerait la permanence de leur statut pendant une si longue période.

Dans les sphéroïdes enrobés en agarose, le défaut de progression en mitose est transitoire et de durée courte, les cellules parviennent finalement à terminer leur division. Un prolongement de la durée de mitose s'accompagne de l'accumulation de dommages à l'ADN [262] et pourrait induire une mauvaise ségrégation des chromosomes. Les défauts de division mis en évidence dans cette étude pourraient participer à l'augmentation de l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales.

b) Impact des contraintes mécaniques sur l'hétérogénéité génétique des cellules au sein des sphéroïdes

Un arrêt des cellules en mitose dans les sphéroïdes contraints entre les murs de PDMS, qu'ils conduisent à la poursuite de la division après un arrêt prolongé, à un *mitotic slippage* suivi de division, ou à une décondensation de l'ADN en absence de division, entraînerait des défauts de division. Dans les sphéroïdes enrobés en agarose, le défaut de mise en place du fuseau mitotique peut être résolu par la cellule mais accompagné de défauts de ségrégation des chromosomes. Ces défauts de division peuvent se présenter sous plusieurs formes, mais ils participent tous à l'augmentation de l'hétérogénéité cellulaire.

D'une part, les sorties de mitose sans division aboutiraient à des cellules ayant un contenu double en ADN. A l'échelle multicellulaire, il y aurait donc une augmentation des cellules polyploïdes au sein des sphéroïdes. Cette hypothèse a été vérifiée par mesure du contenu en ADN des cellules constituant les sphéroïdes contrôles et contraints par cytométrie. Bien que les résultats obtenus soient préliminaires, ils laissent supposer qu'il n'y a pas d'accumulation de cellules polyploïdes sous l'effet des contraintes mécaniques. Il reste possible que la contrainte mécanique induise l'apparition de cellules polyploïdes par absence d'achèvement de la mitose, mais que cet effet ne puisse être observé pour diverses raisons :

- Etant donné que les HCT116 possèdent déjà 7% de cellules polyploïdes (d'après l'ATCC), et que le pourcentage des cellules en mitose est inférieur à 2% (**Figure 4C** de l'article) à un temps donné après 6 jours de croissance entre les murs de PDMS, il est possible que l'induction de cellules polyploïdes par la contrainte mécanique reste trop faible par rapport à la masse cellulaire pour être détectée par cytométrie,
- Il est également possible que ces cellules polyploïdes soient éliminées au cours de la croissance des sphéroïdes ou lors des périodes de réensemencement.
- Les cellules polyploïdes peuvent également s'arrêter de proliférer suite à l'absence de division. Elles restent donc avec 4N chromosomes et se confondent avec les cellules euploïdes en G2 ou mitose comportant 4N chromosomes.

D'autres part, il se pourrait que, même si les cellules poursuivent leur mitose, la division conduise à une ségrégation anormale des chromosomes aboutissant à de l'aneuploïdie. Cette hypothèse a été vérifiée par analyse des caryotypes des cellules provenant des sphéroïdes contrôles et des sphéroïdes contraints, mais n'a pas révélé de tendance d'accumulation de cellules aneuploïdes au sein des sphéroïdes sous l'effet des contraintes mécaniques. Une meilleure analyse n'aurait peut-être pas suffi à mettre à jour une accumulation de cellules aneuploïdes sous l'effet des contraintes mécaniques, car d'après Lengauer *et al.* [263], un nombre de chromosomes différents de 2 est atteint dans moins de 10% des cellules sur 50 générations d'HCT116. De plus, les cellules aneuploïdes induites par défaut de progression en mitose sont généralement éliminées au cours du temps [264]. Thompson *et al.* [264] démontrent que l'aneuploïdie ne peut résulter, seule, de la mauvaise ségrégation des chromosomes, car le gain ou la perte de chromosomes est souvent délétère pour la cellule. L'instabilité chromosomique doit donc s'accompagner d'une modification

phénotypique qui confère un avantage de survie aux cellules aneuploïdes. Il faudrait que la contrainte mécanique confère cet avantage de survie pour que les cellules aneuploïdes puissent perdurer au sein des sphéroïdes. Cependant, les dérégulations du contrôle de la prolifération des cellules tumorales ouvrent toutes les possibilités de destin à des cellules arrêtées en mitose. A titre d'exemple, l'inactivation de p53 permet aux cellules polyploïdes de poursuivre leur prolifération [265, 266].

En conclusion, l'arrêt des cellules en mitose fournit de nombreuses sources de modifications du contenu génétique des cellules. La contrainte mécanique, en altérant la progression en mitose, peut contribuer à l'augmentation de l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales et ainsi potentialiser le développement tumoral.

c) Impact sur l'évolution de la maladie

Le prolongement de la mitose induit par une activation prolongée du point de contrôle mitotique est associé aux tumeurs [267, 268]. Il reste à éclaircir si ce prolongement est une cause ou une conséquence de la tumorigénèse, mais il participe certainement à l'augmentation de l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales qui accompagne la croissance d'une tumeur [269] et qui confèrent des avantages aux cellules tumorales [270].

i. Augmentation de la survie et des mécanismes de défense des cellules tumorales

Les cellules tumorales n'ont pas intérêt à effectuer systématiquement des divisions anormales, elles accumuleraient alors trop d'erreurs qui conduiraient à leur élimination. Cependant, dans de rares cas, de légères erreurs causeraient l'apparition d'une cellule fille ayant des capacités de survie plus importantes que les autres, et feraient acquérir de nouvelles caractéristiques de virulence ou de résistance à la tumeur [271]. L'avantage de survie apporté contrebalancerait la rareté des cas de sélection positive.

De la même façon, les tumeurs accumulent des anomalies des centrosomes au fur et à mesure qu'elles deviennent plus agressives [272]. Il a été proposé que ces défauts apportent des avantages au développement tumoral, mais uniquement si les divisions multipolaires sont partiellement contrôlées afin d'éviter les dérives menant à la mort cellulaire. Ainsi, Ganem *et al.* [273] ont montré que, lorsque les cellules avec des centrosomes surnuméraires

se divisent de façon bipolaires, elles induisent des défauts de ségrégations de chromosomes. Ce phénomène s'explique par un passage transitoire sous forme de division multipolaire, avant le regroupement des centrosomes, qui augmentent les attachements mérotéliques des chromosomes et leur mauvaise ségrégation par *lagging*. Cette dernière pourrait, comme précédemment, participer à l'apparition de cellules filles aux capacités de survie augmentées.

ii. Participation des contraintes mécaniques au développement des capacités invasives des cellules

La migration des cellules tumorales vers des sites distants et l'apparition de métastases nécessitent, d'une part, l'acquisition d'altérations génétiques pro-invasives, d'autre part la modification des propriétés mécaniques des cellules et de leur environnement pour induire et diriger leur invasion [274, 275]. La capacité d'invasion des cellules tumorales inclut la sécrétion de protéases permettant la dégradation du microenvironnement, l'altération de l'adhésion des cellules, et un changement de morphologie des cellules [1] qui correspond parfois à une transition épithélio-mésenchymateuse [276].

Swaminathan *et al.* [277] ont démontré l'impact de la mécanique de cellules cancéreuses provenant de patients sur leurs capacités d'invasion dans du gel mimant la membrane basale. Ils observent que la rigidité des cellules est inversement corrélée aux capacités d'invasion. Les cellules moins rigides présentent davantage de protrusions membranaires et un cortex d'actine moins marqué que les cellules rigides. Cette organisation du cytosquelette d'actomyosine est en partie responsable de l'augmentation de la motilité des cellules. La diminution de la rigidité des cellules par inhibition de la myosine II avec de la Blebbistatine augmente les capacités d'invasion des cellules. Ils montrent également que, au sein d'un même tissu cancéreux, les cellules ne possèdent pas la même rigidité. Cette observation souligne une nouvelle fois la diversité des phénotypes cellulaires au sein d'une tumeur, et l'augmentation des capacités des cellules tumorales à faire développer la maladie.

Sous l'effet de la croissance en agarose, les sphéroïdes conservent leur cohésion et leur tension de surface. Les cellules présentent un cortex d'actine marqué. Tant que le gel n'est pas rompu, son invasion par les cellules des sphéroïdes n'est pas apparante. Il est possible que la compression due à la résistance du gel, augmente la rigidité des cellules tumorales et

participe au maintien de la cohésion cellulaire. Ce modèle pourrait reproduire les microrégions tumorales des tumeurs primaires, qui n'ont pas encore acquis de propriétés d'invasions et qui sont en partie contenues par le microenvironnement mécanique.

Les traitements des sphéroïdes en suspension avec la Blebbistatine et la Latrunculine A induisent la perte de la cohésion cellulaire et de la tension de surface. Ces traitements, en inhibant la contractilité de l'actine, sont connus pour réduire la rigidité cellulaire et altérer la régulation de l'adhésion cellulaire. D'après les résultats de Swaminathan *et al.* [277], ces traitements augmenteraient les capacités d'invasion des cellules. Si les sphéroïdes traités étaient cultivés dans un environnement promouvant l'invasion, les cellules pourraient migrer, ce qui permettrait de reproduire certaines caractéristiques des tumeurs métastatiques.

iii. Augmentation de la désorganisation tissulaire

Le contrôle de l'orientation de l'axe de division participe à la maintenance de l'homéostasie et de l'organisation tissulaire. La contrainte mécanique induit une légère rotation de l'orientation préférentielle de l'axe de division des cellules au sein des sphéroïdes. Cette rotation pourrait suffire, à long terme, à participer à la désorganisation tissulaire du microenvironnement tumoral, qui est un facteur amplifiant le développement tumoral.

3) Enjeux pour la thérapie anticancéreuse

a) *Résistance aux traitements et récurrence du cancer*

Le traitement de sphéroïdes en suspension et de sphéroïdes contraints mécaniquement a révélé des comportements cellulaires différents qui suggèrent que des voies de signalisation sont activées selon l'environnement mécanique des sphéroïdes. Ainsi, la déstabilisation du cytosquelette d'actomyosine inhibe la cytokinèse des cellules des sphéroïdes contrôles et conduit à un fort pourcentage de divisions aberrantes. Ces divisions aberrantes ne sont pas observées dans les sphéroïdes contraints et traités. Que ce soit pour contrôler la progression en mitose, regrouper les centrosomes, ou faire intervenir un autre acteur cellulaire pour terminer la cytokinèse, il semblerait que la contrainte mécanique induise l'activation de voies de signalisation spécifiques. Cette activation réduit les défauts de division provoqués par les traitements.

Parallèlement, la prise en compte du microenvironnement tumoral dans l'étude de l'impact des traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine sur les sphéroïdes pourrait révéler une augmentation de l'invasion par les cellules tumorales. Or, les cellules invasives sont généralement moins prolifératives [278]. Si les sphéroïdes traités étaient cultivés dans un environnement promouvant l'invasion, les cellules migreraient et les traitements n'auraient plus d'effets délétères sur le déroulement de la mitose. Selon la cible des traitements utilisés, un de ces effets adverses serait susceptible de contribuer à la promotion du développement tumoral au lieu de le réduire.

Ainsi, le microenvironnement tumoral, incluant ses aspects biochimiques et biomécaniques, doit être pris en compte dans la réponse des cellules tumorales aux traitements, car il peut révéler des comportements différents selon l'impact qu'ils ont eux-mêmes sur l'organisation tissulaire et sur les propriétés mécaniques des cellules.

Un autre paramètre de la résistance aux traitements est l'acquisition d'altérations génétiques. Les microrégions tumorales étant sous contraintes mécaniques, les erreurs de ségrégation résultant d'une altération de la progression en mitose a probablement lieu *in vivo*, et peuvent apporter une capacité de résistance supplémentaire aux tumeurs. Selon un autre point de vue, il est également envisageable que si l'environnement mécanique des cellules dont la progression en mitose est altérée redevenait favorable au déroulement de la mitose, elles termineraient leur division, de façon plus ou moins fidèle. Ce phénomène surviendrait lorsque les contraintes mécaniques seraient réduites, par exemple après résection chirurgicale partielle ou traitement anticancéreux. Une autre forme de résistance aux traitements se manifeste par la reprise de prolifération de cellules « dormantes ». Si la contrainte, en altérant la progression en mitose, conduit à l'arrêt des cellules en G1 ou en G0, une réduction des contraintes mécaniques pourraient participer à leur reprise de la progression dans le cycle cellulaire ainsi qu'à une recrudescence de la prolifération et de la croissance de la tumeur résiduelle.

b) Identification de nouvelles cibles des agents anticancéreux

La mise en évidence de voies de signalisation et d'un potentiel de résistance aux traitements, spécifiquement activés sous l'effet des contraintes mécaniques, illustre l'importance de la prise en considération du microenvironnement mécanique dans l'étude de la réponse aux traitements anticancéreux. L'effet de traitement connu, comme celui de la Latrunculine A, peut n'être plus observable sur les cellules sous contraintes mécaniques. Il est possible que des traitements, utilisés en routine en clinique, n'ont en fait pas l'effet escompté sur les cellules tumorales de tumeurs particulièrement rigides. On devrait évaluer l'effet des traitements selon les propriétés mécaniques des cellules tumorales et de leur microenvironnement. De plus, l'identification des voies de signalisation spécifiquement activées sous l'effet des contraintes mécaniques permettrait de révéler de nouvelles cibles potentielles des agents anticancéreux. Ces voies de signalisation n'étant pas révélées par des méthodes de cultures classiques en 2D, et même en 3D, nécessiteraient la mise au point d'une méthode de criblage adaptée. D'une part, la méthode d'enrobage dans de l'agarose reste compatible avec une analyse globale (sans dissociation) des sphéroïdes, soit par mesure de leur taille, soit par évaluation de l'expression d'un marqueur. D'autre part, une technique de mesure des propriétés mécaniques des sphéroïdes est actuellement en développement dans l'équipe, pour une utilisation de routine adaptée aux cribles de molécules actives. Elle repose sur la mesure du déplacement de piliers de PDMS qui entourent un sphéroïde en croissance. Selon la lignée cellulaire, les sphéroïdes en croissance n'ont pas la même capacité de déplacement des piliers. La mesure de ce déplacement permet de déduire les forces dégagées par les sphéroïdes sur leur environnement. La recherche de molécules réduisant ces forces pourrait par exemple être détectée par une diminution du déplacement des piliers.

MATERIELS ET METHODES

1) Culture cellulaire

a) Culture des cellules

Les cellules de la lignée d'adénocarcinome colique HCT116 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium, Gibcon) complémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 2mM/L de pénicilline/streptomycine, dans une atmosphère humide à 5% CO₂ et à 37°C. Les cellules HCT116 exprimant l'histone H2B fusionnée à la mCherry ont été obtenues par transduction lentivirale et sont maintenues en culture dans les mêmes conditions.

b) Obtention des sphéroïdes

Les sphéroïdes sont produits dans des plaques 96 puits à fond rond préalablement recouvertes avec du polyHema (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), Sigma) à 20mg/ml afin d'empêcher l'adhésion des cellules. 100µl de milieu contenant une suspension de 200 à 500 cellules HCT116 sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont centrifugées 6 minutes à 1200rpm (200g) à température ambiante, puis placées en atmosphère humide à 5% CO₂ et à 37°C. Cette technique permet l'obtention d'un seul sphéroïde par puits. La variation de taille entre les différents sphéroïdes est inférieure à 10% (données non publiées).

2) Culture des sphéroïdes contraints entre les murs de PDMS

a) Fabrication du dispositif en PDMS :

Le moule en silicium a été produit en collaboration avec K. Grenier (LAAS). Le PDMS (polydiméthylsiloxane) (Sylgard) est produit comme préconisé dans le protocole fourni, c'est-à-dire en mélangeant 10% d'agent réticulant au volume final de PDMS. Il est dégazé sous une cloche à vide puis coulé dans le moule. Après un second dégazage, le moule et le PDMS sont placés 6h à 80°C pour permettre la polymérisation du PDMS. Le dispositif est ensuite démoulé.

Le PDMS a été choisi comme constituant des microdispositifs de confinement pour ses propriétés physiques [279]. Outre le fait qu'il soit facile à fabriquer et transparent, il est inerte chimiquement, perméable aux gaz et imperméable à l'eau. Concernant ses propriétés biomécaniques, il est non adhérent, non dégradé par les cellules et surtout non toxique.

b) Mise sous contrainte

Des sphéroïdes de 280 à 300µm de diamètre sont transférés à l'aide d'une micropipette à proximité des microdispositifs remplis de milieu de culture puis déplacés entre les murs de PDMS avec une aiguille. Ils sont mis en atmosphère humide à 5% CO₂ et à 37°C. Les sphéroïdes sont cultivés entre les murs de PDMS pendant 6 jours, au terme desquels les différentes analyses sont réalisées. Le milieu est renouvelé une fois pendant cette durée de culture.

3) Culture des sphéroïdes enrobés dans l'agarose 1%

Les sphéroïdes sont obtenus comme précisé ci-dessus. Quand ils atteignent une taille de 650µm de diamètre, ils sont transférés dans de l'Agarose Low Melting Point à la concentration de 10g/L (1%) (Euromedex). Pour l'imagerie au SPIM, les sphéroïdes sont directement déposés dans les cuves en Phytigel comme décrit plus en aval. Pour les coupes à congélation, les sphéroïdes sont enrobés dans des carottes d'agarose fabriquées avec des capillaires fins. Lorsque l'agarose se fige, les carottes sont démoulées et les sphéroïdes distribués dans des puits de plaques 96 puits.

4) Marquages des cellules

a) Immunofluorescence sur coupes de sphéroïdes

Les sphéroïdes en suspension, contraints entre les murs de PDMS ou enrobés dans l'agarose sont fixés pendant 3h à 4°C dans de la formaline (Sigma), puis rincés dans du PBS et transférés dans des solutions de sucrose à 15% et 30% successivement, pendant 24h à 4°C. Ils sont ensuite enrobés dans un milieu de cryomontage (Tissue-tek, Sakura Finetek). Des coupes de 7 et 15µm d'épaisseur sont réalisées avec un cryostat (Leica - CM1950) et déposées sur des lames de verre puis placées sous vide à température ambiante pour la nuit, avant d'être stockées à -20°C.

Pour réaliser les marquages en immunofluorescence, les coupes sont soumises à une post-fixation de 20 min à 4°C dans une solution de formaline. Selon les anticorps, un démasquage d'antigènes est réalisé en faisant bouillir les lames placées dans un tampon citrate (1,8mM d'acide citrique et 8mM de citrate de sodium). Après blocage dans du PBS/1% BSA/0.5% Triton X-100 0,1%, les lames sont incubées dans une solution contenant l'anticorps primaire

à la concentration et pour une durée précisée ci-dessous, puis contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/800^{ème} pendant 1h à température ambiante.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants:

- Anticorps anti Ki-67 (rabbit, polyclonal, Santa Cruz) dilué au 1/200^{ème}, laissé agir pendant une nuit à 4°C ;
- Anticorps anti Cycline A (mouse, monoclonal, Abcam) dilué au 1/50^{ème}, laissé agir pendant la nuit à 4°C ;
- Anticorps anti PARP-1 (rabbit, monoclonal, Epitomics) dilué au 1/1000^{ème}, laissé agir pendant 1h à 37°C ;
- Anticorps anti H3P (rabbit, polyclonal, Millipore) dilué au 1/1000^{ème}, laissé agir pendant 1h à 37°C ;
- Anticorps anti E-Cadhérine (mouse, monoclonal, Abcam) dilué au 1/200^{ème}, laissé agir pendant 72h à 4°C ;
- Anticorps anti γ -tubuline (mouse, monoclonal, Sigma) dilué au 1/5000^{ème}, laissé agir pendant 72h à 4°C ;
- Anticorps anti YAP (rabbit, polyclonal, Cell Signaling) dilué au 1/5000^{ème}, laissé agir pendant la nuit à 4°C ;

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un Alexa 488, 594, ou 687 (Molecular Probes, 1/800).

Les filaments d'actine ont été détectés en incubant les lames avec de la Phalloïdine directement couplée à un Alexa 488 ou 594 (Invitrogen) diluée au 1/400^{ème} pendant 20 minutes à température ambiante.

b) Détection de l'hypoxie intracellulaire

Afin de détecter la présence de zones hypoxiques, les sphéroïdes sont incubés pendant 2 heures à 37°C en présence de 100 μ M de pimonidazole (Euromedex). Dans un environnement hypoxique, le pimonidazole est réduit et se lie aux groupements SH des protéines. La détection du pimonidazole est faite par l'incubation avec un anticorps spécifique MAb1 couplé au FITC dilué au 1/300^{ème} pendant 2h à 37°C (HypoxyprobeTM-1 Plus Kit, HPI).

c) Incorporation d'EdU

L'incorporation et la détection d'EdU sont effectuées avec le Click-iT® EdU Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes). L'EdU (5-ethynyl-29-deoxyuridine) est un analogue de la thymidine incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé. Il est ajouté dans le milieu de culture des sphéroïdes pendant une durée de 24 heures, à la concentration de 10µM. Sa détection est effectuée sur les coupes à congélation en incubant les lames dans le tampon de révélation préparé selon les instructions du producteur.

d) Marquage de l'ADN et fin de traitement des lames

Le marquage des noyaux au DAPI est réalisé par l'incubation des lames dans une solution contenant 0,1µg/ml de DAPI pendant 10 min à l'obscurité. Après un lavage rapide, les lames sont montées à l'aide du milieu de montage (Dako).

5) Imagerie et analyse des images en fluorescence de coupes à congélation

Les images en fluorescence de coupes à congélation de 7µm d'épaisseur sont réalisées avec un microscope à épifluorescence DM5000 (Leica) comportant une caméra ES CCD COOLsnap (Roper). Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ :

- Les moyennes d'intensité de fluorescence correspondent à la moyenne d'intensité de chaque pixel sur la pile d'images entières. Elles représentent la distribution d'un marquage à partir de plusieurs échantillons issus d'au moins 2 expériences indépendantes.
- Les décomptes des densités cellulaires et des cellules H3P+/EdU- ont été effectués manuellement à partir des coupes de 6 à 15 sphéroïdes par conditions issus de 3 expériences indépendantes.
- L'analyse de la forme des cellules à partir du marquage des jonctions intercellulaires (E-Cadhérine) est effectuée en extrayant les paramètres d'aire et de circularité des contours de chaque cellule d'intérêt effectués manuellement sous ImageJ. Les résultats de la Figure S1 sont issus de plusieurs sphéroïdes provenant d'une seule expérience.

L'analyse du nombre de pôles des cellules mitotiques a été réalisée avec le logiciel Imaris 7.0.0 (Bitplane).

Les traitements statistiques ont été effectués avec les logiciels Microsoft Excel et Prism. Les tests statistiques correspondent au Wilcoxon Mann-Whitney.

Les images en fluorescence de coupes à congélation de 15µm d'épaisseur sont réalisées avec un microscope multiphoton confocal LSM510 NLO (Zeiss), avec un objectif x40 ou x63. L'imagerie nécessite l'utilisation séquentielle des lasers 488 et 594nm et d'un laser pulsé à 750nm pour la détection du DAPI. Les images sont traitées avec le logiciel Zen 2009 (Zeiss).

6) Imagerie et analyse des sphéroïdes en lumière transmise

Les images en lumière transmise sont acquises avec un microscope MacroFluo Z16 APO (Leica) comportant une caméra ES CCD COOLsnap (Roper). Les acquisitions en temps réel en lumière transmise sont réalisées avec un microscope champ large (Zeiss) avec un objectif 10X (NA 0,3). Les analyses de relâchement des sphéroïdes après retrait des microdispositifs et les analyses de croissance des sphéroïdes sont réalisées avec le logiciel ICY (Cellomics Technologies, Compartmental Bioapplication-Thermo Scientific). Les analyses de rugosité sont réalisées avec le logiciel ImageJ, par segmentation des sphéroïdes et extraction du paramètre « solidity ». L'écartement des bords des incisions ont été mesurées manuellement sous ImageJ. Toutes ces analyses ont été effectuées sur plusieurs sphéroïdes par conditions issus de 2 expériences indépendantes au minimum.

7) Analyses de l'hétérogénéité génétique des cellules

a) Cytométrie

Les cellules provenant d'une 60^{aine} de sphéroïdes contrôle ou contraints sont trypsinisés pendant plusieurs minutes jusqu'à dissociation complète. Les cellules sont ensuite :

- soit directement traitées pour l'analyse au cytomètre,
- soit réensemencées afin d'être traitées au Paclitaxel. Elles sont réensemencées 2-3 jours puis traitées au Paclitaxel à 100nM pendant 14h avant d'être décollées et récupérées pour l'analyse au cytomètre.
- soit réutilisées pour un cycle de culture sous forme de sphéroïdes. Elles sont réensemencées dans des boîtes de cultures en 2D pour 2-3 jours, avant d'être utilisées à nouveau pour obtenir des sphéroïdes. Les cellules provenant des

sphéroïdes en suspension sont utilisées pour la culture de sphéroïdes contrôles, et celles provenant de sphéroïdes contraints pour la culture de sphéroïdes transférés dans les microdispositifs pendant 6 jours. Au terme de ces 6 jours, les sphéroïdes sont à nouveau dissociés, et les cellules partagées entre une analyse au cytomètre et un nouveau cycle de culture. Trois cycles de cultures ont été effectués avec les mêmes cellules.

Pour la préparation des cellules à l'analyse au cytomètre, les culots cellulaires obtenus après centrifugation à 1400 rpm pendant 3 minutes à 4°C, sont rincés puis fixés par ajout goutte à goutte de $\frac{3}{4}$ de volume final d'Ethanol 100% à -20°C, et réservés au moins 2h à -20°C. Une nuit après, les cellules sont réhydratées dans du PBS/ 1% BSA, rincées, puis perméabilisées 7min à 0°C dans du tampon PBS/ 1% BSA / 0.25% Triton X-100. Après un nouveau rinçage, elles sont marquées pendant 20 minutes avec du Iodure de Propidium dilué au 1/100^{ème} (accompagné de 1/50^{ème} de RNase). Elles sont ensuite analysées avec un cytomètre (C6-Accuri). Les données sont acquises et étudiées à l'aide du logiciel CFlow Plus.

b) Etalement chromosomique

Les cellules provenant d'une 15^{aine} de sphéroïdes contrôles ou contraints sont trypsinisés pendant plusieurs minutes jusqu'à dissociation complète. Elles sont réensemencées 2-3 jours puis traitées à la Démécolcemid à 0,02µg/mL pendant 2h afin de les accumuler en mitose. Elles sont ensuite décollées par trypsination et rincées. Les culots cellulaires obtenus après centrifugation sont resuspendus dans 10mL de KCl à 75mM pendant 10 minutes à 37°C. 2mL de solution fixatrice froide (1 volume d'acide acétique pour 3 d'éthanol 100%) sont ajoutés et les cellules sont centrifugées 10 minutes à 1500rpm. Après 3 lavages espacés de 30 minutes effectués avec la solution fixatrice, le culot peut être conservé à 4°C. L'étalement et le marquage des cellules au Giemsa sont réalisées à l'Institut Fédératif de Biologie (Purpan, Toulouse). Des gouttes de solution fixatrice concentrée en cellules sont jetées avec une pipette paster à poire sur les lames. Ces lames sont vieilles pendant une journée. Le marquage des lames s'effectue en plongeant les lames successivement dans :

- de la Trypsine, 20 secondes
- une solution de PBS pour rincer
- une solution de Giemsa pendant 30 secondes

Les lames sont rincées sous l'eau avant d'être analysées avec un microscope à lumière transmise et un objectif X100. Seules les cellules parfaitement étalées permettaient de compter le nombre exact de chromosomes.

8) Contrôle de la diffusion de la Blebbistatine à travers les gels

La Blebbistatine présente un pic d'absorption à 424nm. L'absorbance à une longueur d'onde donnée est proportionnelle à la concentration en molécules absorbantes pour des cuves de mesures d'absorbance de 1cm de côté. La mesure de l'absorbance d'une gamme de concentrations de Blebbistatine permet de connaître le facteur de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration en Blebbistatine. La diffusion de la Blebbistatine à travers les gels a été mesurée à partir de la densité optique des solutions contenant la Blebbistatine. De grandes cuves fabriquées en Phytigel et en Agarose Low Melting Point 1% ont été trempées dans une solution de PBS contenant de la Blebbistatine à 37°C. 24h après, la solution avait diffusé à l'intérieur des cuves. Les densités optiques des solutions contenues à l'extérieur et à l'intérieur des cuves ont été mesurées et comparées à une courbe étalon afin d'en déterminer les concentrations (**Figure S2**).

9) Imagerie des sphéroïdes au SPIM

a) Montage des échantillons

Le montage des échantillons est effectué comme dans Desmaison *et al.* [181]. Brièvement, des cuves sont moulées avec du Phytigel à la concentration de 10g/L dans du PBS. Elles sont remplies de milieu et un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry est déposé dedans pour l'imagerie en SPIM. Pour contraindre les sphéroïdes, les cuves sont remplies d'agarose 1% encore liquide et contenant un sphéroïde. Les échantillons de sphéroïdes contraints sont préparés 24h avant le début de l'acquisition, puis immergés dans du milieu et remis dans une atmosphère humide à 5% CO₂ et à 37°C jusqu'au moment d'imager. Les traitements sont ajoutés au milieu et à l'agarose 24h avant le début de l'acquisition concernant les échantillons traités.

b) Acquisition en 3D et en temps réel

Le montage du SPIM et l'imagerie en 3D et en temps réel sont effectués comme précisé dans Lorenzo *et al.* [179]. Brièvement, les cuves sont suspendues par une tige et immergées dans du milieu (avec ou sans traitement) contenu dans une chambre physiologique. L'imagerie des sphéroïdes en temps réel n'est pas triviale car il est nécessaire au préalable de bien régler l'orientation et la localisation de la feuille de lumière pour qu'elle soit placée sur le plan focal de détection. Les mouvements des sphéroïdes dans les cuves peuvent compliquer l'imagerie sur de longues durées. Les sphéroïdes sont imagés un à un pour des durées maximales de 4h. Des stacks de 170 à 300µm depuis la périphérie du sphéroïde vers la profondeur, avec un pas de 1µm sont acquis toutes les 4 minutes en moyenne.

10) Détermination des durées des étapes de la mitose des sphéroïdes imagés au SPIM

Les acquisitions sont préalablement traitées par un programme Matlab développé par l'équipe de mathématiciens PRIMO à l'ITAV, afin de réduire les mouvements du sphéroïde imagé en recalant l'image en x, y et z après détection du sphéroïde. Les fichiers TIF sont ensuite convertis en un fichier adapté au logiciel d'analyse d'images en 3D, Imaris. Les cellules mitotiques sont repérées dans les sphéroïdes par les changements de la morphologie de l'ADN. Chaque cellule mitotique repérée est individuellement suivie dans le temps. Les temps de début de condensation, d'établissement de la plaque métaphasique et d'anaphase sont relevés pour en déduire les durées de prométaphases et de métaphases. Les analyses ont été effectuées sur 14 sphéroïdes provenant de 7 expériences indépendantes concernant les sphéroïdes contrôles et contraints non traités, et sur 3 à 6 sphéroïdes provenant d'au moins 2 expériences indépendantes pour les conditions traitées.

11) Détermination de l'orientation de l'axe de division des mitoses au sein des sphéroïdes

L'axe de division est déterminé par la droite passant par les deux pôles du fuseau mitotique. La plaque métaphasique s'établit sur un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique et donc à l'axe de division. Aucun mouvement de rotation de l'axe de division n'étant visible entre la métaphase et l'anaphase sur les séquences étudiées, l'axe de division est défini comme étant l'axe perpendiculaire au plan de la plaque métaphasique au temps précédent

l'anaphase (**Figure 46C**). L'organisation des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique occupe un ellipsoïde plein, aplati et homogène (**Figure 46A**). La création d'une surface correspondant à chaque plaque métaphasique est effectuée à partir du logiciel Imaris (Bitplane). De ces surfaces sont extraits le centre de masse et les 3 axes des ellipsoïdes correspondants. Un ellipsoïde est caractérisé par trois axes d'orientations perpendiculaires et de longueurs différentes (**Figure 46B**). Au niveau de l'ellipsoïde défini par la plaque métaphasique, les deux axes les plus longs sont ceux qui déterminent systématiquement le plan de la plaque métaphasique. L'axe perpendiculaire aux précédents est le plus court, il correspond à l'axe d'aplatissement et il est orienté dans le sens de l'axe de division, le long de la droite fictive liant les deux pôles du fuseau. L'orientation de cet axe indique donc l'orientation de l'axe de division de la mitose.

L'orientation de l'axe de division des mitoses au sein du sphéroïde est mesurée par rapport à la tangente à la surface du sphéroïde, au point à la surface le plus proche de la cellule en mitose (**Figure 47A**). Pour obtenir ce référentiel, un programme Matlab a été développé par le Dr. Pierre Weiss, un mathématicien de l'équipe PRIMO (ITAV/CNRS USR3505, Toulouse, France). Le programme repose sur un algorithme d'analyse de l'orientation des noyaux par rapport à leur position dans le sphéroïde. L'algorithme se décompose en 2 parties principales décrites dans les paragraphes ci-dessous. L'utilisateur fournit :

- une image 3D de sphéroïde,
- une liste d'ellipsoïdes correspondant aux plaques métaphasiques repérées dans les sphéroïdes

A partir de ces données, l'algorithme :

- 1/ extrait l'enveloppe du sphéroïde,
- 2/ trouve pour chaque centre d'ellipsoïde le point de l'enveloppe le plus proche,
- 3/ compare la normale à l'enveloppe en ce point et l'orientation de l'ellipsoïde déterminée par le vecteur propre associé à la plus petite valeur propre de la matrice définissant l'ellipsoïde.

L'extraction de l'enveloppe du sphéroïde est une tâche simple mais non triviale car dans certaines expériences, tous les noyaux ne sont pas marqués et la qualité d'imagerie en profondeur est généralement mauvaise. L'algorithme suivant semble robuste, rapide et bien adapté à la problématique de l'analyse de la géométrie des sphéroïdes.

- L'image est d'abord débruitée avec une convolution par une gaussienne

- Elle est ensuite seuillée pour obtenir une image binaire approchant la forme de l'enveloppe. Cette approximation est cependant grossière car certains noyaux ne sont pas marqués.
- Cette forme est régularisée en trouvant son enveloppe convexe (le polyèdre convexe le plus petit qui contient tous les points de l'image binaire). Cette opération retourne une triangulation.

Pour détecter le point le plus proche à l'enveloppe, la projection du centre de l'ellipsoïde est calculée sur tous les plans contenant les faces de la triangulation. On peut ainsi trouver le triangle qui est à la distance la plus courte du centre. La normale à ce triangle est calculée et comparée à l'axe le plus petit de l'ellipsoïde approchant le noyau.

En sortie, le programme indique la distance de la mitose à la surface, et l'orientation de l'axe de division par rapport à la normale à la surface. En retranchant 90° à cette orientation, on obtient une orientation par rapport à la tangente à la surface. Le programme fournit également un stack comportant l'enveloppe du sphéroïde, le point à la surface le plus proche et le segment qui joint ce point à la mitose. En superposant ce stack avec celui du sphéroïde (**Figure 47B-D**), il est possible vérifier que la mitose a été bien localisée, et que la coque a été bien définie. Comme les acquisitions n'ont pas été faites sur l'ensemble du sphéroïde, il arrive que le point S ne corresponde pas à un point de la surface du sphéroïde, mais à une zone tronquée par l'acquisition. Le stack fourni par le script permet aussi de vérifier ce paramètre. Toutes ces précautions assurent que la distance et l'angle évalués par le script sont exacts. Seules les valeurs parfaitement correctes ont été incluses dans les résultats, ce qui explique que leur nombre soit restreint. Une valeur d'orientation proche de 0° signifie que la cellule se divise parallèlement à la surface. A l'inverse, une orientation proche de 90° signifie que la cellule se divise perpendiculairement à la surface. Par souci de simplification, l'orientation par rapport à la tangente à la surface a été simplifiée en orientation par rapport à la surface.

12) Détermination de l'organisation des noyaux au sein des sphéroïdes

L'idée principale du programme consiste à décrire le sphéroïde comme un continuum : plutôt que de chercher les propriétés individuelles de chaque cellule, on décrit des quantités continues telles que des densités de cellules, une orientation préférentielle ou une

anisotropie locale. Dans les modèles mathématiques issus de la mécanique des milieux continus, on considère le sphéroïde non pas comme un ensemble de cellules discrètes mais plutôt comme un fluide continu avec des propriétés mécaniques définies en chaque point de l'espace [280]. Cette vision des choses permet de construire des algorithmes d'analyse automatisée d'image très différents. Dans ce travail nous avons utilisé des algorithmes simples, robustes et rapides reposant sur les tenseurs de structure [281]. Des coupes à congélation de sphéroïdes dont les noyaux ont été marqués au DAPI sont analysées. Brièvement, le programme est divisé en trois étapes :

- 1/ segmentation de la frontière du sphéroïde par recherche d'une enveloppe convexe,
- 2/ calcul du tenseur de structure. Le tenseur de structure est un outil qui permet de déterminer l'orientation locale de champs d'ellipses (2D) ainsi que leur anisotropie (le rapport entre le petit et le grand axe). Le tenseur de structure renvoie une matrice 2x2 en chaque pixel ou voxel de l'image. Le vecteur propre associé à la plus grande valeur propre de cette matrice indique l'orientation locale de l'image. Pour un champs d'ellipses, cette orientation est l'orientation du grand axe.
- 3/ L'orientation locale des noyaux est assimilée au vecteur propre associé à la plus grande valeur propre des tenseurs. Cette orientation est alors comparée en chaque point du sphéroïde avec la normale de la surface au point le plus proche.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hanahan, D., and Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646-674.
2. Binder-Foucard, F., Belot, A., Delafosse, P., Remontet, L., Woronoff, A.-S., and Bossard, N. eds. (2013). Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012 : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim, Partie 1 – Tumeurs solides.
3. Logothetis, C.J., Efstathiou, E., Manuguid, F., and Kirkpatrick, P. (2011). Abiraterone acetate. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 573-574.
4. Mullard, A. (2012). 2011 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 91-94.
5. Mullard, A. (2011). Accelerated approval dust begins to settle. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 797-798.
6. Gravit, L. (2012). Physical scientists take on cancer. *Nature* **491**, S49.
7. Correia, A.L., and Bissell, M.J. (2012). The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resistance Updates* **15**, 39-49.
8. Graham, C.H., Kobayashi, H., Stankiewicz, K.S., Man, S., Kapitan, S.J., and Kerbel, R.S. (1994). Rapid Acquisition of Multicellular Drug Resistance After a Single Exposure of Mammary Tumor Cells to Antitumor Alkylating Agents. *Journal of the National Cancer Institute* **86**, 975-982.
9. Wells, A., Griffith, L., Wells, J.Z., and Taylor, D.P. (2013). The Dormancy Dilemma: Quiescence versus Balanced Proliferation. *Cancer Research* **73**, 3811-3816.
10. Bidard, F.-C., Vincent-Salomon, A., Sigal-Zafrani, B., Rodrigues, M., Diéras, V., Mignot, L., Sastre-Garau, X., Poupon, M.-F., and Pierga, J.-Y. (2008). Time to metastatic relapse and breast cancer cells dissemination in bone marrow at metastatic relapse. *Clinical & Experimental Metastasis* **25**, 871-875.
11. Karrison, T.G., Ferguson, D.J., and Meier, P. (1999). Dormancy of Mammary Carcinoma after mastectomy. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 80-85.
12. Jain, R.K. (1988). Determinants of Tumor Blood Flow: A Review. *Cancer Research* **48**, 2641-2658.
13. Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., and Jain, R.K. (2000). Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. *Cancer Research* **60**, 2497-2503.
14. Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* **99**, 31-68.
15. Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* **1**, 46-54.
16. Allen, M., and Louise Jones, J. (2011). Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.* **223**, 163-177.
17. Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* **17**, 320-329.
18. Dolberg, D.S., and Bissell, M.J. (1984). Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* **309**, 552-556.
19. Tlsty, T.D. (2001). Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Seminars in Cancer Biology* **11**, 97-104.
20. Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research* **59**, 5002-5011.

21. Barcellos-Hoff, M.H., and Ravani, S.A. (2000). Irradiated Mammary Gland Stroma Promotes the Expression of Tumorigenic Potential by Unirradiated Epithelial Cells. *Cancer Research* 60, 1254-1260.
22. Di Paolo, A., and Bocci, G. (2007). Drug distribution in tumors: mechanisms, role in drug resistance, and methods for modification. *Current Oncology Reports* 9, 109-114.
23. Heldin, C.-H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure [mdash] an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 806-813.
24. Dang, C.V., and Semenza, G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 68-72.
25. Park, C.C., Zhang, H.J., Yao, E.S., Park, C.J., and Bissell, M.J. (2008). B1 Integrin Inhibition Dramatically Enhances Radiotherapy Efficacy in Human Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research* 68, 4398-4405.
26. Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., et al. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 15, 68-74.
27. Weigelt, B., Lo, A., Park, C., Gray, J., and Bissell, M. (2010). HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Research and Treatment* 122, 35-43.
28. Polo, M., Arnoni, M., Riggio, M., Wargon, V., Lanari, C., and Novaro, V. (2010). Responsiveness to PI3K and MEK inhibitors in breast cancer. Use of a 3D culture system to study pathways related to hormone independence in mice. *PLoS ONE* 5, e10786.
29. Nelson, C.M., and Bissell, M.J. (2005). Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Seminars in Cancer Biology* 15, 342-352.
30. Kim, J.B. (2005). Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 15, 365-377.
31. Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* 139, 891-906.
32. Butcher, D.T., Alliston, T., and Weaver, V.M. (2009). A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 9, 108-122.
33. Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., et al. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.
34. Schrader, J., Gordon-Walker, T.T., Aucott, R.L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S.J., Wells, R.G., and Iredale, J.P. (2011). Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53, 1192-1205.
35. Jonietz, E. (2012). The forces of cancer. *Nature* 491, S56-57.
36. Krouskop, T.A., Wheeler, T.M., Kallel, F., Garra, B.S., and Hall, T. (1998). Elastic Moduli of Breast and Prostate Tissues under Compression. *Ultrasonic Imaging* 20, 260-274.
37. Evans, A., Whelehan, P., Thomson, K., Brauer, K., Jordan, L., Purdie, C., McLean, D., Baker, L., Vinnicombe, S., and Thompson, A. (2012). Differentiating benign from malignant solid breast masses: value of shear wave elastography according to lesion

- stiffness combined with greyscale ultrasound according to BI-RADS classification. *Br J Cancer* **107**, 224-229.
38. Paszek, M., and Weaver, V. (2004). The Tension Mounts: Mechanics Meets Morphogenesis and Malignancy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **9**, 325-342.
 39. Stylianopoulos, T., Martin, J.D., Chauhan, V.P., Jain, S.R., Diop-Frimpong, B., Bardeesy, N., Smith, B.L., Ferrone, C.R., Hornicek, F.J., Boucher, Y., et al. (2012). Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 15101-15108.
 40. Gordon, V.D., Valentine, M.T., Gardel, M.L., Andor-Ardó, D., Dennison, S., Bogdanov, A.A., Weitz, D.A., and Deisboeck, T.S. (2003). Measuring the mechanical stress induced by an expanding multicellular tumor system: a case study. *Experimental Cell Research* **289**, 58-66.
 41. Wang, H.-B., Dembo, M., and Wang, Y.-L. (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **279**, C1345-C1350.
 42. Provenzano, P., Eliceiri, K., Campbell, J., Inman, D., White, J., and Keely, P. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine* **4**, 38.
 43. Raub, C.B., Unruh, J., Suresh, V., Krasieva, T., Lindmo, T., Gratton, E., Tromberg, B.J., and George, S.C. (2008). Image Correlation Spectroscopy of Multiphoton Images Correlates with Collagen Mechanical Properties. *Biophysical Journal* **94**, 2361-2373.
 44. Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
 45. Mantovani, A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36-37.
 46. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.
 47. Kaupila, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A., and Risteli, L. (1998). Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *The Journal of Pathology* **186**, 262-268.
 48. Padera, T.P., Stoll, B.R., Tooredman, J.B., Capen, D., Tomaso, E.d., and Jain, R.K. (2004). Pathology: Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature* **427**, 695-695.
 49. Boucher, Y., and Jain, R.K. (1992). Microvascular Pressure Is the Principal Driving Force for Interstitial Hypertension in Solid Tumors: Implications for Vascular Collapse. *Cancer Research* **52**, 5110-5114.
 50. Yu, H., Mouw, J.K., and Weaver, V.M. (2011). Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends in Cell Biology* **21**, 47-56.
 51. Janmey, P.A., Winer, J.P., Murray, M.E., and Wen, Q. (2009). The hard life of soft cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 597-605.
 52. Stoker, A.W., Hatier, C., and Bissell, M.J. (1990). The embryonic environment strongly attenuates v-src oncogenesis in mesenchymal and epithelial tissues, but not in endothelia. *J Cell Biol* **111**, 217-228.
 53. Kulesa, P.M., Kasemeier-Kulesa, J.C., Teddy, J.M., Margaryan, N.V., Seftor, E.A., Seftor, R.E.B., and Hendrix, M.J.C. (2006). Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3752-3757.

54. Brown, A.C., Fiore, V.F., Sulchek, T.A., and Barker, T.H. (2013). Physical and chemical microenvironmental cues orthogonally control the degree and duration of fibrosis-associated epithelial-to-mesenchymal transitions. *The Journal of Pathology* 229, 25-35.
55. Gomez, E.W., Chen, Q.K., Gjorevski, N., and Nelson, C.M. (2010). Tissue geometry patterns epithelial–mesenchymal transition via intercellular mechanotransduction. *Journal of Cellular Biochemistry* 110, 44-51.
56. Klein, E.A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F.J., Xu, T., Levental, I., Hawthorne, E., Janmey, P.A., and Assoian, R.K. (2009). Cell-Cycle Control by Physiological Matrix Elasticity and In Vivo Tissue Stiffening. *Current Biology* 19, 1511-1518.
57. Nelson, C.M., Jean, R.P., Tan, J.L., Liu, W.F., Sniadecki, N.J., Spector, A.A., and Chen, C.S. (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11594-11599.
58. Boghaert, E., Gleghorn, J.P., Lee, K., Gjorevski, N., Radisky, D.C., and Nelson, C.M. (2012). Host epithelial geometry regulates breast cancer cell invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 19632-19637.
59. Helmlinger, G., Netti, P.A., Lichtenbeld, H.C., Melder, R.J., and Jain, R.K. (1997). Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nature Biotechnology* 15, 778-783.
60. Cheng, G., Tse, J., Jain, R.K., and Munn, L.L. (2009). Micro-Environmental Mechanical Stress Controls Tumor Spheroid Size and Morphology by Suppressing Proliferation and Inducing Apoptosis in Cancer Cells. *PLoS ONE* 4, e4632-.
61. Pelham, R.J., and Wang, Y.-I. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 13661-13665.
62. Lo, C.-M., Wang, H.-B., Dembo, M., and Wang, Y.-I. (2000). Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal* 79, 144-152.
63. Hadjipanayi, E., Mudera, V., and Brown, R.A. (2009). Guiding cell migration in 3D: A collagen matrix with graded directional stiffness. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 121-128.
64. Pathak, A., and Kumar, S. (2012). Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 10334-10339.
65. Pathak, A., and Kumar, S. (2013). Transforming potential and matrix stiffness co-regulate confinement sensitivity of tumor cell migration. *Integrative Biology* 5, 1067-1075.
66. Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 63-73.
67. DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction.
68. Tanzer, M.L. (2006). Current concepts of extracellular matrix. 11, 326-331-.
69. Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie* 53, 430-442.
70. Kanzaki, Y., Terasaki, F., Okabe, M., Fujita, S., Katashima, T., Otsuka, K., and Ishizaka, N. (2010). Three-Dimensional Architecture of Cardiomyocytes and Connective Tissue

- in Human Heart Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Circulation* 122, 1973-1974.
71. Reinhart-King, C.A., Dembo, M., and Hammer, D.A. (2008). Cell-Cell Mechanical Communication through Compliant Substrates. *Biophysical Journal* 95, 6044-6051.
 72. Chen, C.S., Tan, J., and Tien, J. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annual Review of Biomedical Engineering* 6, 275-302.
 73. Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3, 466-472.
 74. Choquet, D., Felsenfeld, D.P., and Sheetz, M.P. (1997). Extracellular Matrix Rigidity Causes Strengthening of Integrin-Cytoskeleton Linkages. *Cell* 88, 39-48.
 75. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D.R., and Yamada, K.M. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 294, 1708-1712.
 76. Gjorevski, N., Boghaert, E., and Nelson, C. (2012). Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition by Transmission of Mechanical Stress through Epithelial Tissues. *Cancer Microenvironment* 5, 29-38.
 77. Renshaw, M.W., Price, L.S., and Schwartz, M.A. (1999). Focal Adhesion Kinase Mediates the Integrin Signaling Requirement for Growth Factor Activation of Map Kinase. *The Journal of Cell Biology* 147, 611-618.
 78. Collinet, C., Lecuit, T., and Frans van, R. (2013). Chapter Two - Stability and Dynamics of Cell-Cell Junctions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Volume Volume 116. (Academic Press), pp. 25-47.
 79. Gomez, G.A., McLachlan, R.W., and Yap, A.S. (2011). Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends in Cell Biology* 21, 499-505.
 80. Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *Journal of Cell Science* 108, 127-142.
 81. Nagafuchi, A., Ishihara, S., and Tsukita, S. (1994). The roles of catenins in the cadherin-mediated cell adhesion: functional analysis of E-cadherin-alpha catenin fusion molecules. *The Journal of Cell Biology* 127, 235-245.
 82. Vasioukhin, V., and Fuchs, E. (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 76-84.
 83. Kobiela, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* 6, 21-30.
 84. Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M., and Yap, A.S. (2005). Myosin 2 Is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell-Cell Contacts. *Molecular Biology of the Cell* 16, 4531-4542.
 85. le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* 189, 1107-1115.
 86. Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.

87. Janmey, P.A., Euteneuer, U., Traub, P., and Schliwa, M. (1991). Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *The Journal of Cell Biology* 113, 155-160.
88. Cortese, J., Schwab III, B., Frieden, C., and Elson, E. (1989). Actin polymerization induces a shape change in actin-containing vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 5113-5777.
89. Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J., and Hyman, A.A. (2011). Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* 469, 226-230.
90. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* 271, 20246-20249.
91. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science* 273, 245-248.
92. Gieni, R.S., and Hendzel, M.J. (2008). Mechanotransduction from the ECM to the genome: Are the pieces now in place? *J. Cell. Biochem.* 104, 1964-1987.
93. Maniotis, A., Chen, C., and Ingber, D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 849-854.
94. Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., and Shackleton, S. (2006). SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology* 26, 3738-3751.
95. Kubben, N., Voncken, J., and Misteli, T. (2010). Mapping of protein- and chromatin-interactions at the nuclear lamina. *Nucleus* 1, 460-471.
96. Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development* 22, 832-853.
97. Baarlink, C., and Grosse, R. (2014). Formin'actin in the nucleus. *Nucleus* 5, 15-20.
98. Treisman, R. (2013). Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 376-377.
99. Martins, R.P., Finan, J.D., Farshid, G., and Lee, D.A. (2012). Mechanical Regulation of Nuclear Structure and Function. *Annual Review of Biomedical Engineering* 14, 431-455.
100. de las Heras, J.I., Batrakou, D.G., and Schirmer, E.C. (2013). Cancer biology and the nuclear envelope: A convoluted relationship. *Seminars in Cancer Biology* 23, 125-137.
101. Mendez, M.G., and Janmey, P.A. (2012). Transcription factor regulation by mechanical stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 728-732.
102. Piccolo, S., Cordenonsi, M., and Dupont, S. (2013). Molecular Pathways: YAP and TAZ Take Center Stage in Organ Growth and Tumorigenesis. *Clinical Cancer Research* 19, 4925-4930.
103. Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* 154, 1047-1059.

104. Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, Bridget T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., et al. (2011). Yap1 Acts Downstream of aCatenin to Control Epidermal Proliferation. *Cell* 144, 782-795.
105. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.
106. Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M.A., Goldstein, L.S.B., Abujarour, R., et al. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Development* 24, 1106-1118.
107. Pan, D. (2010). The Hippo Signaling Pathway in Development and Cancer. *Developmental Cell* 19, 491-505.
108. Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, Anna R., Poletti, A., et al. (2011). The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell* 147, 759-772.
109. Harvey, K.F., Zhang, X., and Thomas, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 246-257.
110. Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.-J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & Development* 26, 1300-1305.
111. Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138, 3907-3914.
112. Newton, I. ed. (1687). *Philosophiæ Naturalis Principia Mathematica* (Newton's personally annotated 1st edition).
113. Tsou, M.-F.B., and Stearns, T. (2006). Controlling centrosome number: licenses and blocks. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 74-78.
114. Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *The Journal of Cell Biology* 124, 223-233.
115. Paul, R., Wollman, R., Silkworth, W.T., Nardi, I.K., Cimini, D., and Mogilner, A. (2009). Computer simulations predict that chromosome movements and rotations accelerate mitotic spindle assembly without compromising accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 15708-15713.
116. Magidson, V., O'Connell, Christopher B., LonÄ arek, J., Paul, R., Mogilner, A., and Khodjakov, A. (2011). The Spatial Arrangement of Chromosomes during Prometaphase Facilitates Spindle Assembly. *Cell* 146, 555-567.
117. Morin, X., and Bellaïche, Y. (2011). Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Developmental Cell* 21, 102-119.
118. Lu, M.S., and Johnston, C.A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* 140, 1843-1856.
119. Musacchio, A., and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.
120. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F., G, and Taylor, S., S (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* 22, R966-R980.

121. De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 Complex as a Template for Mad2 Activation in the Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* 15, 214-225.
122. Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
123. Scolnick, D.M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406, 430-435.
124. Cortez, D., and Elledge, S.J. (2000). Conducting the mitotic symphony. *Nature* 406, 354-356.
125. Pease, J.C., and Tirnauer, J.S. (2011). Mitotic spindle misorientation in cancer-out of alignment and into the fire. *Journal of Cell Science* 124, 1007-1016.
126. Quyn, A.J., Appleton, P.L., Carey, F.A., Steele, R.J.C., Barker, N., Clevers, H., Ridgway, R.A., Sansom, O.J., and N?thke, I.S. (2010). Spindle Orientation Bias in Gut Epithelial Stem Cell Compartments Is Lost in Precancerous Tissue. *Cell Stem Cell* 6, 175-181.
127. Fededa, J.P., and Gerlich, D.W. (2012). Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol* 14, 440-447.
128. Green, R.A., Paluch, E., and Oegema, K. (2012). Cytokinesis in Animal Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28, 29-58.
129. Kittur, H., Weaver, W., and Di Carlo, D. (2014). Well-plate mechanical confinement platform for studies of mechanical mutagenesis. *Biomedical Microdevices*, 1-9.
130. Tse, H., Weaver, W., and Di Carlo, D. (2012). Increased Asymmetric and Multi-Daughter Cell Division in Mechanically Confined Microenvironments. *PLoS ONE* 7, e38986.
131. Lancaster, O.M., Le Berre, M.I., Dimitracopoulos, A., Bonazzi, D., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Picone, R., Duke, T., Piel, M., and Baum, B. (2013). Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation. *Developmental Cell* 25, 270-283.
132. Itabashi, T., Terada, Y., Kuwana, K., Kan, T., Shimoyama, I., and Ishiwata, S.i. (2012). Mechanical impulses can control metaphase progression in a mammalian cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 7320-7325.
133. Minc, N., Burgess, D., and Chang, F. (2011). Influence of Cell Geometry on Division-Plane Positioning. *Cell* 144, 414-426.
134. Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J* 26, 1487-1498.
135. O'Connell, C.B., and Wang, Y.-I. (2000). Mammalian Spindle Orientation and Position Respond to Changes in Cell Shape in a Dynein-dependent Fashion. *Mol. Biol. Cell* 11, 1765-1774.
136. Fernandez, P., Maier, M., Lindauer, M., Kuffer, C., Storchova, Z., and Bausch, A.R. (2011). Mitotic Spindle Orients Perpendicular to the Forces Imposed by Dynamic Shear. *PLoS ONE* 6, e28965.
137. Zhao, L., Sang, C., Yang, C., and Zhuang, F. (2011). Effects of stress fiber contractility on uniaxial stretch guiding mitosis orientation and stress fiber alignment. *Journal of Biomechanics* 44, 2388-2394.

138. Thery, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., and Julicher, F. (2007). Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* **447**, 493-496.
139. Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* **7**, 947-953.
140. Fink, J., Carpi, N., Betz, T., Betard, A., Chebah, M., Azoune, A., Bornens, M., Sykes, C., Fetler, L., Cuvelier, D., et al. (2011). External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol* **13**, 771-778.
141. den Elzen, N., Buttery, C., Maddugoda, M., Ren, G., and Yap, A.S. (2009). Cadherin Adhesion Receptors Orient the Mitotic Spindle during Symmetric Cell Division in Mammalian Epithelia. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 3740-3750.
142. Gibson, W.T., Veldhuis, J.H., Rubinstein, B., Cartwright, H.N., Perrimon, N., Brodland, G.W., Nagpal, R., and Gibson, M.C. (2011). Control of the Mitotic Cleavage Plane by Local Epithelial Topology. *Cell* **144**, 427-438.
143. Noatynska, A., Gotta, M., and Meraldi, P. (2012). Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: Cause or consequence? *The Journal of Cell Biology* **199**, 1025-1035.
144. Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Briskin, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell* **138**, 1083-1095.
145. Sugiarto, S., Persson, Anders I., Munoz, Elena G., Waldburger, M., Lamagna, C., Andor, N., Hanecker, P., Ayers-Ringler, J., Phillips, J., Siu, J., et al. (2011). Asymmetry-Defective Oligodendrocyte Progenitors Are Glioma Precursors. *Cancer Cell* **20**, 328-340.
146. Thoma, C.R., Toso, A., Gutbrodt, K.L., Reggi, S.P., Frew, I.J., Schraml, P., Hergovich, A., Moch, H., Meraldi, P., and Krek, W. (2009). VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat Cell Biol* **11**, 994-1001.
147. Patel, V., Li, L., Cobo-Stark, P., Shao, X., Somlo, S., Lin, F., and Igarashi, P. (2008). Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Human Molecular Genetics* **17**, 1578-1590.
148. Jaffe, A.B., Kaji, N., Durgan, J., and Hall, A. (2008). Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* **183**, 625-633.
149. Vasiliev, J.M., Omelchenko, T., Gelfand, I.M., Feder, H.H., and Bonder, E.M. (2004). Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: A link to the mechanism of cancer dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12526-12530.
150. Humar, B., and Guilford, P. (2009). Hereditary diffuse gastric cancer: A manifestation of lost cell polarity. *Cancer Science* **100**, 1151-1157.
151. Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 839-845.
152. Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177-184.
153. Mueller-Klieser, W., and Sutherland, R.M. (1982). Oxygen tensions in Multicell Spheroids of two cell lines. *British Journal of Cancer* **45**, 256-264.

154. Rodriguez-Enriquez, S., Gallardo-Perez, J.C., Aviles-Salas, A., Marin-Hernandez, A., Carreno-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., and Moreno-Sanchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol* **216**, 189-197.
155. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* **148**, 3-15.
156. Ivascu, A., and Kubbies, M. (2007). Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *International Journal of Oncology* **31**, 1403-1413.
157. St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Florenes, V.A., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1998). E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* **142**, 557-571.
158. Konze, S.A., van Diepen, L., Schröder, A., Olmer, R., Möller, H., Pich, A., Weissmann, R., Kuss, A.W., Zweigerdt, R., and Buettner, F.F.R. (2014). Cleavage of E-cadherin and B-catenin by calpain affects Wnt signaling and spheroid formation in suspension cultures of human pluripotent stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics*.
159. Nederman, T., Norling, B., Glimelius, B., Carlsson, J., and Brunk, U. (1984). Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Research* **44**, 3090-3097.
160. Bjerkvig, R., Laerum, O.D., and Rucklidge, G.J. (1989). Immunocytochemical Characterization of Extracellular Matrix Proteins Expressed by Cultured Glioma Cells. *Cancer Research* **49**, 5424-5428.
161. Waleh, N.S., Gallo, J., Grant, T.D., Murphy, B.J., Kramer, R.H., and Sutherland, R.M. (1994). Selective Down-Regulation of Integrin Receptors in Spheroids of Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* **54**, 838-843.
162. Santini, M.T., Rainaldi, G., and Indovina, P.L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **36**, 75-87.
163. Weigelt, B., and Bissell, M.J. (2008). Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Seminars in Cancer Biology* **18**, 311-321.
164. Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., et al. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology* **1**, 84-96.
165. McMahon, K.M., Volpato, M., Chi, H.Y., Musiwaro, P., Poterlowicz, K., Peng, Y., Scally, A.J., Patterson, L.H., Phillips, R.M., and Sutton, C.W. (2012). Characterization of Changes in the Proteome in Different Regions of 3D Multicell Tumor Spheroids. *Journal of Proteome Research* **11**, 2863-2875.
166. Ghosh, S., Spagnoli, G.C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., and Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology* **204**, 522-531.
167. Lobjois, V., Frongia, C., Jozan, S., Truchet, I., and Valette, A. (2009). Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *European Journal of Cancer* **45**, 2402-2411.

168. Oloumi, A., MacPhail, S.H., Johnston, P.J., Banath, J.P., and Olive, P.L. (2000). Changes in Subcellular Distribution of Topoisomerase IIa Correlate with Etoposide Resistance in Multicell Spheroids and Xenograft Tumors. *Cancer Research* 60, 5747-5753.
169. Desoize, B., and Jardillier, J. (2000). Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 193-207.
170. Kunz-Schughart, L.A., Freyer, J.P., Hofstaedter, F., and Ebner, R. (2004). The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *Journal of Biomolecular Screening* 9, 273-285.
171. Ivascu, A., and Kubbies, M. (2006). Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. *Journal of Biomolecular Screening* 11, 922-932.
172. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protocols* 4, 309-324.
173. Dubessy, C., Merlin, J.-L., Marchal, C., and Guillemin, F. (2000). Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36, 179-192.
174. Reid, B.G., Jerjian, T., Patel, P., Zhou, Q., Yoo, B.H., Kabos, P., Sartorius, C.A., and V, L.D. (2014). Live Multicellular Tumor Spheroid models for high-content imaging and screening in cancer drug discovery. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine* 8, 27-35.
175. Friedrich, J., Eder, W., Castaneda, J., Doss, M., Huber, E., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2007). A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-D Culture: The Acid Phosphatase Assay. *Journal of Biomolecular Screening* 12, 925-937.
176. Weber, M., and Huiskens, J. (2012). Omnidirectional microscopy. *Nat Meth* 9, 656-657.
177. Huiskens, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., and Stelzer, E.H.K. (2004). Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* 305, 1007-1009.
178. Greger, K., Swoger, J., and Stelzer, E.H.K. (2007). Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Review of Scientific Instruments* 78, -.
179. Lorenzo, C., Frongia, C., Jorand, R., Fehrenbach, J., Weiss, P., Maandhui, A., Gay, G., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2011). Live cell division dynamics monitoring in 3D large spheroid tumor models using light sheet microscopy. *Cell Division* 6, 22.
180. Verveer, P.J., Swoger, J., Pampaloni, F., Greger, K., Marcello, M., and Stelzer, E.H.K. (2007). High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nat Meth* 4, 311-313.
181. Desmaison, A., Lorenzo, C., Rouquette, J., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2013). A versatile sample holder for single plane illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 251, 128-132.
182. Hochmuth, R.M. (2000). Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics* 33, 15-22.
183. Anderson, K.W., Wi, L., Cezeaux, J., and Zimmer, S. (1991). In vitro studies of deformation and adhesion properties of transformed cells. *Cell Biophysics* 18, 81-97.
184. Guevorkian, K., Gonzalez-Rodriguez, D., Carlier, C., Dufour, S., and Brochard-Wyart, F. (2011). Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 13387-13392.

185. Guevorkian, K., Colbert, M.-J., Durth, M., Dufour, S., and Brochard-Wyart, F. (2010). Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Physical Review Letters* *104*, 218101.
186. Levental, I., Levental, K.R., Klein, E.A., Assoian, R., Miller, R.T., Wells, R.G., and Janmey, P.A. (2010). A simple indentation device for measuring micrometer-scale tissue stiffness. *Journal of Physics: Condensed Matter* *22*, 194120.
187. Stirbat, T.V., Mgharbel, A., Bodennec, S., Ferri, K., Mertani, H., Rieu, J.-P., and Delanoë-Ayari, H. (2013). Fine Tuning of Tissues' Viscosity and Surface Tension through Contractility Suggests a New Role for α -Catenin. *PLoS ONE* *8*, e52554.
188. Foty, R.A., Pflieger, C.M., Forgacs, G., and Steinberg, M.S. (1996). Surface tensions of embryonic tissues predict their mutual envelopment behavior. *Development* *122*, 1611-1620.
189. Legant, W.R., Miller, J.S., Blakely, B.L., Cohen, D.M., Genin, G.M., and Chen, C.S. (2010). Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices. *Nat Meth* *7*, 969-971.
190. Loessner, D., Flegg, J.A., Byrne, H.M., Clements, J.A., and Hutmacher, D.W. (2013). Growth of confined cancer spheroids: a combined experimental and mathematical modelling approach. *Integrative Biology* *5*, 597-605.
191. Montel, F., Delarue, M., Elgeti, J., Malaquin, L., Basan, M., Risler, T., Cabane, B., Vignjevic, D., Prost, J., Cappello, G., et al. (2011). Stress clamp experiments on Multicellular Tumor Spheroids. *Physical Review Letters* *107*, 188102.
192. Campas, O., Mammoto, T., Hasso, S., Sperling, R.A., O'Connell, D., Bischof, A.G., Maas, R., Weitz, D.A., Mahadevan, L., and Ingber, D.E. (2014). Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nat Meth* *11*, 183-189.
193. Laurent, J., Frongia, C., Cazales, M., Mondesert, O., Ducommun, B., and Lobjois, V. (2013). Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3D. *BMC Cancer* *13*, 73.
194. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* *132*, 487-498.
195. Jorand, R., Le Corre, G., Andilla, J., Maandhui, A., Frongia, C., Lobjois, V., Ducommun, B., and Lorenzo, C. (2012). Deep and Clear Optical Imaging of Thick Inhomogeneous Samples. *PLoS ONE* *7*, e35795.
196. Chaly, N., and Brown, D.L. (1988). The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis. *Journal of Cell Science* *91*, 325-335.
197. Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-Cyclin E Activity for Repeated Centrosome Reproduction in Xenopus Egg Extracts. *Science* *283*, 851-854.
198. Dumont, S., and Mitchison, T.J. (2009). Force and Length in the Mitotic Spindle. *Current Biology* *19*, R749-R761.
199. Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *The Journal of Cell Biology* *130*, 941-948.
200. Stumpff, J., Wagenbach, M., Franck, A., Asbury, Charles L., and Wordeman, L. (2012). Kif18A and Chromokinesins Confine Centromere Movements via Microtubule Growth Suppression and Spatial Control of Kinetochore Tension. *Developmental Cell* *22*, 1017-1029.

201. DeLuca, J.G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J.M., Salmon, E.D., and McEwen, B.F. (2005). Hec1 and Nuf2 Are Core Components of the Kinetochore Outer Plate Essential for Organizing Microtubule Attachment Sites. *Molecular Biology of the Cell* 16, 519-531.
202. Chan, Y.W., Fava, L.L., Uldschmid, A., Schmitz, M.H.A., Gerlich, D.W., Nigg, E.A., and Santamaria, A. (2009). Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *The Journal of Cell Biology* 185, 859-874.
203. Tanenbaum, M.E., and Medema, R.H. (2010). Mechanisms of Centrosome Separation and Bipolar Spindle Assembly. *Developmental Cell* 19, 797-806.
204. Vaisberg, E.A., Koonce, M.P., and McIntosh, J.R. (1993). Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation. *The Journal of Cell Biology* 123, 849-858.
205. Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., and Mitchison, T.J. (2000). Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol, a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin, Eg5. *The Journal of Cell Biology* 150, 975-988.
206. Kwon, M., Morales-Mulia, S., Brust-Mascher, I., Rogers, G.C., Sharp, D.J., and Scholey, J.M. (2004). The Chromokinesin, KLP3A, Drives Mitotic Spindle Pole Separation during Prometaphase and Anaphase and Facilitates Chromatid Motility. *Molecular Biology of the Cell* 15, 219-233.
207. Toso, A., Winter, J.R., Garrod, A.J., Amaro, A.C., Meraldi, P., and McAinsh, A.D. (2009). Kinetochore-generated pushing forces separate centrosomes during bipolar spindle assembly. *The Journal of Cell Biology* 184, 365-372.
208. Sandquist, J., Kita, A., and Bement, W. (2011). And the Dead Shall Rise: Actin and Myosin Return to the Spindle. *Developmental Cell* 21, 410-419.
209. Rosenblatt, J., Cramer, L.P., Baum, B., and McGee, K.M. (2004). Myosin II-Dependent Cortical Movement Is Required for Centrosome Separation and Positioning during Mitotic Spindle Assembly. *Cell* 117, 361-372.
210. Cao, J., Crest, J., Fasulo, B., and Sullivan, W. (2010). Cortical Actin Dynamics Facilitate Early-Stage Centrosome Separation. *Current Biology* 20, 770-776.
211. Moulding, D.A., Blundell, M.P., Spiller, D.G., White, M.R.H., Cory, G.O., Calle, Y., Kempinski, H., Sinclair, J., Ancliff, P.J., Kinnon, C., et al. (2007). Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 2213-2224.
212. Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., and Mitchison, T.J. (2003). Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor. *Science* 299, 1743-1747.
213. Shutova, M., Yang, C., Vasiliev, J.M., and Svitkina, T. (2012). Functions of Nonmuscle Myosin II in Assembly of the Cellular Contractile System. *PLoS ONE* 7, e40814.
214. Johnson, E.M., Berk, D.A., Jain, R.K., and Deen, W.M. (1996). Hindered diffusion in agarose gels: test of effective medium model. *Biophysical Journal* 70, 1017-1023.
215. Charras, G.T. (2008). A short history of blebbing. *Journal of Microscopy* 231, 466-478.
216. Coué, M., Brenner, S.L., Spector, I., and Korn, E.D. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters* 213, 316-318.
217. Kunda, P., Pelling, A.E., Liu, T., and Baum, B. (2008). Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis. *Current Biology* 18, 91-101.

218. Balzer, E.M., Tong, Z., Paul, C.D., Hung, W.-C., Stroka, K.M., Boggs, A.E., Martin, S.S., and Konstantopoulos, K. (2012). Physical confinement alters tumor cell adhesion and migration phenotypes. *The FASEB Journal* 26, 4045-4056.
219. Woolner, S., and Papalopulu, N. (2012). Spindle Position in Symmetric Cell Divisions during Epiboly Is Controlled by Opposing and Dynamic Apicobasal Forces. *Developmental Cell* 22, 775-787.
220. O'Connell, C.B., Warner, A.K., and Wang, Y.-I. (2001). Distinct roles of the equatorial and polar cortices in the cleavage of adherent cells. *Current Biology* 11, 702-707.
221. Wu, Q., Sahasrabudhe, R.M., Luo, L.Z., Lewis, D.W., Gollin, S.M., and Saunders, W.S. (2010). Deficiency in myosin light-chain phosphorylation causes cytokinesis failure and multipolarity in cancer cells. *Oncogene* 29, 4183-4193.
222. Choudhary, A., Lera, R.F., Martowicz, M.L., Oxendine, K., Laffin, J.J., Weaver, B.A., and Burkard, M.E. (2013). Interphase cytofission maintains genomic integrity of human cells after failed cytokinesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 13026-13031.
223. Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut. *Cell* 131, 847-860.
224. Uyeda, T.Q.P., and Nagasaki, A. (2004). Variations on a theme: the many modes of cytokinesis. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 55-60.
225. Gerisch, G., and Weber, I. (2000). Cytokinesis without myosin II. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 126-132.
226. Neujahr, R., Heizer, C., and Gerisch, G. (1997). Myosin II-independent processes in mitotic cells of *Dictyostelium discoideum*: redistribution of the nuclei, re-arrangement of the actin system and formation of the cleavage furrow. *Journal of Cell Science* 110, 123-137.
227. Neujahr, R., Albrecht, R., Kohler, J., Matzner, M., Schwartz, J.M., Westphal, M., and Gerisch, G. (1998). Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *Journal of Cell Science* 111, 1227-1240.
228. Burton, K., and Taylor, D.L. (1997). Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature* 385, 450-454.
229. Bi, E., Maddox, P., Lew, D.J., Salmon, E.D., McMillan, J.N., Yeh, E., and Pringle, J.R. (1998). Involvement of an Actomyosin Contractile Ring in *Saccharomyces cerevisiae* Cytokinesis. *The Journal of Cell Biology* 142, 1301-1312.
230. Shimizu, Y., Kushida, Y., Kiriya, S., Nakano, K., and Numata, O. (2013). Formation and Ingression of Division Furrow Can Progress Under the Inhibitory Condition of Actin Polymerization in Ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Zoological Science* 30, 1044-1049.
231. Canman, J.C., and Bement, W.M. (1997). Microtubules suppress actomyosin-based cortical flow in *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science* 110, 1907-1917.
232. O'Connell, C.B., Wheatley, S.P., Ahmed, S., and Wang, Y.-I. (1999). The Small GTP-binding Protein Rho Regulates Cortical Activities in Cultured Cells during Division. *The Journal of Cell Biology* 144, 305-313.
233. Matzke, R., Jacobson, K., and Radmacher, M. (2001). Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat Cell Biol* 3, 607-610.

234. Guha, M., Zhou, M., and Wang, Y.-I. (2005). Cortical Actin Turnover during Cytokinesis Requires Myosin II. *Current Biology* 15, 732-736.
235. Robinson, D.N. (2001). Cell division: Biochemically controlled mechanics. *Current Biology* 11, R737-R740.
236. Werner, M., Munro, E., and Glotzer, M. (2007). Astral Signals Spatially Bias Cortical Myosin Recruitment to Break Symmetry and Promote Cytokinesis. *Current Biology* 17, 1286-1297.
237. Bringmann, H., and Hyman, A.A. (2005). A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. *Nature* 436, 731-734.
238. Herszterg, S., Pinheiro, D., and Bellaïche, Y. (2013). A multicellular view of cytokinesis in epithelial tissue. *Trends in Cell Biology*.
239. Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature* 453, 751-756.
240. Luxenburg, C., Amalia Pasolli, H., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2011). Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat Cell Biol* 13, 203-214.
241. Campinho, P., Behrndt, M., Ranft, J., Risler, T., Minc, N., and Heisenberg, C.-P. (2013). Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly. *Nat Cell Biol* 15, 1405-1414.
242. Kuffer, C., Kuznetsova, A., and Storchova, Z. (2013). Abnormal mitosis triggers p53-dependent cell cycle arrest in human tetraploid cells. *Chromosoma* 122, 305-318.
243. Kwon, M., Godinho, S.A., Chandhok, N.S., Ganem, N.J., Azioune, A., Thery, M., and Pellman, D. (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & Development* 22, 2189-2203.
244. Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.o.B., and Margolis, R.L. (2001). Tetraploid State Induces p53-dependent Arrest of Nontransformed Mammalian Cells in G1. *Molecular Biology of the Cell* 12, 1315-1328.
245. Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043-1047.
246. Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint" . *The Journal of Cell Biology* 165, 609-615.
247. Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biology* 6.
248. Uetake, Y., and Sluder, G. (2010). Prolonged Prometaphase Blocks Daughter Cell Proliferation Despite Normal Completion of Mitosis. *Current Biology* 20, 1666-1671.
249. Han, J., and Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 364-371.
250. Thornton, T.M., and Rincon, M. (2009). Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. *International Journal of Biological Sciences* 5, 44-52.
251. Raghunathan, V.K., Morgan, J.T., Dreier, B., Reilly, C.M., Thomasy, S.M., Wood, J.A., Ly, I., Tuyen, B.C., Hughbanks, M., Murphy, C.J., et al. (2013). Role of Substratum Stiffness in Modulating Genes Associated with Extracellular Matrix and Mechanotransducers YAP and TAZ. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54, 378-386.

252. Shahbazi, M.N., Megias, D., Epifano, C., Akhmanova, A., Gundersen, G.G., Fuchs, E., and Perez-Moreno, M. (2013). CLASP2 interacts with p120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions. *The Journal of Cell Biology* 203, 1043-1061.
253. Peglion, F., and Etienne-Manneville, S. (2013). p120catenin alteration in cancer and its role in tumour invasion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368.
254. Waterman-Storer, C.M., Salmon, W.C., and Salmon, E.D. (2000). Feedback Interactions between Cell-Cell Adherens Junctions and Cytoskeletal Dynamics in Newt Lung Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell* 11, 2471-2483.
255. Stehbens, S.J., Paterson, A.D., Crampton, M.S., Shewan, A.M., Ferguson, C., Akhmanova, A., Parton, R.G., and Yap, A.S. (2006). Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Journal of Cell Science* 119, 1801-1811.
256. Alvarez-Fernandez, M., Sanchez-Martinez, R., Sanz-Castillo, B., Gan, P.P., Sanz-Flores, M., Trakala, M., Ruiz-Torres, M., Lorca, T., Castro, A., and Malumbres, M. (2013). Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17374-17379.
257. Blagosklonny, M.V. (2007). Mitotic Arrest and Cell Fate: Why and How Mitotic Inhibition of Transcription Drives Mutually Exclusive Events. *Cell Cycle* 6, 70-74.
258. Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2008). Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* 14, 111-122.
259. Gottesfeld, J.M., and Forbes, D.J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 197-202.
260. Brito, D.A., and Rieder, C.L. (2006). Mitotic Checkpoint Slippage in Humans Occurs via Cyclin B Destruction in the Presence of an Active Checkpoint. *Current Biology* 16, 1194-1200.
261. Han, C., Jun, D., Lee, J., and Kim, Y. (2014). Prometaphase arrest-dependent phosphorylation of Bcl-2 and Bim reduces the association of Bcl-2 with Bak or Bim, provoking Bak activation and mitochondrial apoptosis in nocodazole-treated Jurkat T cells. *Apoptosis* 19, 224-240.
262. Dalton, W.B., Nandan, M.O., Moore, R.T., and Yang, V.W. (2007). Human Cancer Cells Commonly Acquire DNA Damage during Mitotic Arrest. *Cancer Research* 67, 11487-11492.
263. Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623-627.
264. Thompson, S.L., and Compton, D.A. (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *The Journal of Cell Biology* 180, 665-672.
265. Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint. *Developmental Cell* 7, 637-651.
266. Sablina, A.A., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. (1999). p53 does not control the spindle assembly cell cycle checkpoint but mediates G1 arrest in response to disruption of microtubules system. *Cell Biology International* 23, 323-334.

267. Sissen, J., Bonner, S., Grash, S., Powell, D., and Donaldson, E. (1985). Alterations in metaphase durations in cells derived from human tumours. *Cell and Tissue Kinetics* 18, 137-146.
268. Therman, E., Buchler, D.A., Nieminen, U., and Timonen, S. (1984). Mitotic modifications and aberrations in human cervical cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 11, 185-197.
269. Gao, C., Furge, K., Koeman, J., Dykema, K., Su, Y., Cutler, M.L., Werts, A., Haak, P., and Vande Woude, G.F. (2007). Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8995-9000.
270. Dalton, W.B., and Yang, V.W. (2009). Role of prolonged mitotic checkpoint activation in the formation and treatment of cancer. *Future Oncology* 5, 1363-1370.
271. Brinkley, B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends in Cell Biology* 11, 18-21.
272. Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L., and Doxsey, S.J. (2001). Centrosome Defects Can Account for Cellular and Genetic Changes That Characterize Prostate Cancer Progression. *Cancer Research* 61, 2212-2219.
273. Ganem, N.J., Godinho, S.A., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278-282.
274. Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.
275. Kumar, S., and Weaver, V. (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer and Metastasis Reviews* 28, 113-127.
276. Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2005). Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition? *Cancer Research* 65, 5991-5995.
277. Swaminathan, V., Mythreye, K., O'Brien, E.T., Berchuck, A., Blobe, G.C., and Superfine, R. (2011). Mechanical Stiffness Grades Metastatic Potential in Patient Tumor Cells and in Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 71, 5075-5080.
278. Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003). Cost of Migration: Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Treatment. *Journal of Clinical Oncology* 21, 1624-1636.
279. McDonald, J.C., and Whitesides, G.M. (2002). Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Accounts of Chemical Research* 35, 491-499.
280. Bresch, D., Colin, T., Grenier, E., Ribba, B., and Saut, O. (2009). A viscoelastic model for avascular tumor growth. *Discrete and continuous dynamical systems*, 101-108.
281. Brox, T., Van Den Boomgaard, R., Lauze, F., Van De Weijer, J., Weickert, J., Mrázek, P., and Kornprobst, P. eds. (2006). Adaptive structure tensors and their applications. In *Visualization and processing of tensor fields* (Springer Berlin Heidelberg).

LEGENDES DES FILMS

Film 2 : Film d'un sphéroïde qui a subi une incision perpendiculairement au mur passant par le milieu du sphéroïdes. Le bord incisé est le bord supérieur, qui se rétracte rapidement suite à l'incision. Le film démarre 10 secondes après l'incision et une photo est prise toutes les 20 secondes pendant 30 minutes.

Film 3 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Cette représentation donne une idée de la dynamique des noyaux au sein du sphéroïde au cours du temps. On peut également y repérer quelques mitoses (flèches).

Film 4 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, de deux mitoses appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contrôle, extrait d'une acquisition comparable à celle du film 1. On peut facilement repérer, pour chacune d'elles, la condensation de l'ADN, la mise en place de la plaque métaphasique, et l'anaphase.

Film5 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Les flèches indiquent les mitoses repérables.

Film 6 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, d'une mitose appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h, et extrait d'une acquisition comparable à celle du film 3. A nouveau, on peut facilement repérer les étapes de condensation de l'ADN, de mise en place de la plaque métaphasique, et d'anaphase. On peut toutefois y noter une conformation des chromosomes en rosace qui perdure assez longtemps entre la condensation de l'ADN et l'établissement de la plaque métaphasique.

Film 7 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry traité à la Blebbistatine et contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Les flèches indiquent les mitoses repérables.

Film 8 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, de deux mitoses appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry traité à la Blebbistatine et contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h, et extrait d'une acquisition comparable à celle du film 5.

Film 9 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry traité à la Latrunculine A et contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de

l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Les flèches indiquent les mitoses repérables.

Film 10 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, de deux mitoses appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry traité à la Latrunculine A et contraint dans de l'agarose 1% depuis 24h, et extrait d'une acquisition comparable à celle du film 7.

Film 11 :

(A) Film de la progression en mitose d'une cellule de sphéroïde contrôle non traité en représentation 3D .

(B) Film identique au (A) mais pour lequel la surface créée est superposée à la fluorescence de la cellule.

Film 12 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contrôle traité à la Blebbistatine. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Les flèches indiquent les mitoses repérables. Les flèches blanches indiquent les mitoses provenant de cellules mononucléées et achevant une division bipolaire. Les flèches oranges indiquent les mitoses provenant de cellules binucléées. Les flèches vertes indiquent les mitoses multipolaires.

Film 13 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, de deux mitoses appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contrôle traité à la Blebbistatine, et extrait d'une acquisition comparable à celle du film 9. Les deux mitoses proviennent d'une cellule binucléée chacune. L'une des deux achève une division bipolaire, alors que l'autre achève une mitose tripolaire.

Film 14 : Film d'un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contrôle traité à la Latrunculine A. Chaque temps correspond à l'aplatissement maximal de l'ensemble des images acquises en profondeur dans le sphéroïde au temps correspondant. Les flèches blanches indiquent les mitoses provenant de cellules mononucléées et achevant une division bipolaire. Les flèches oranges indiquent les mitoses provenant de cellules binucléées. Les flèches vertes indiquent les mitoses multipolaires.

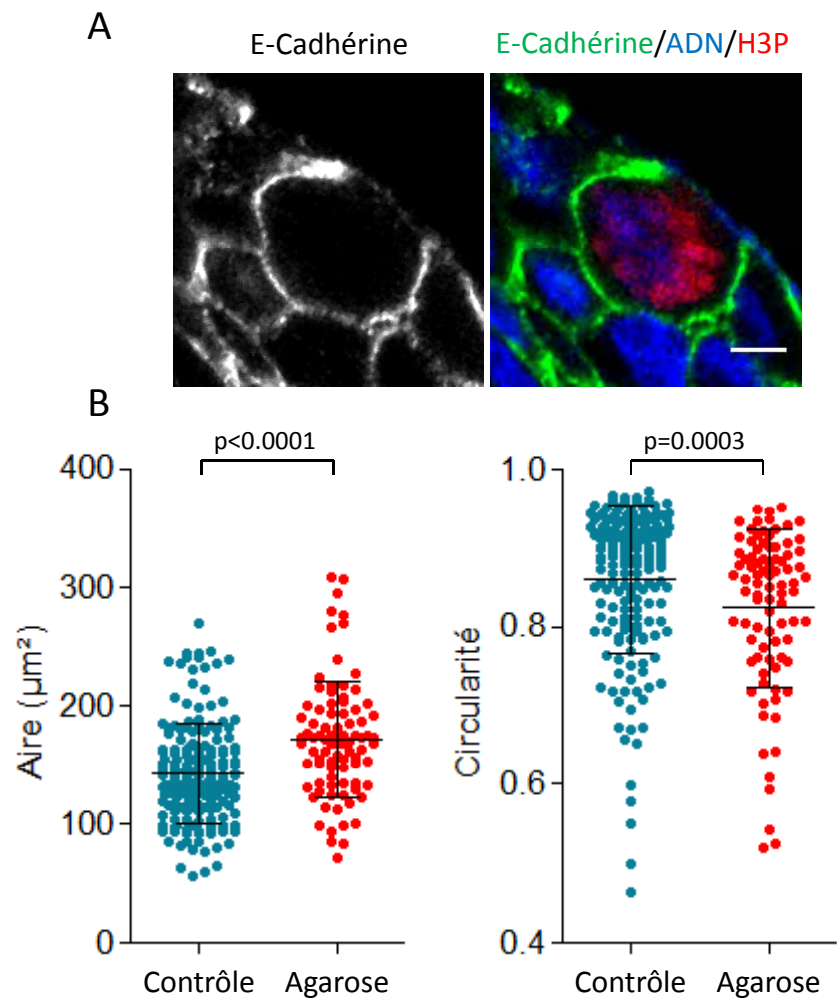
Film 15 : Film d'une représentation 3D obtenue sous Imaris, de deux mitoses appartenant à un sphéroïde HCT116-H2B-mCherry contrôle traité à la Latrunculine A, et extrait d'une acquisition comparable à celle du film 11. Une des divisions est bipolaire et l'autre est tripolaire, provenant probablement d'une cellule binucléée.

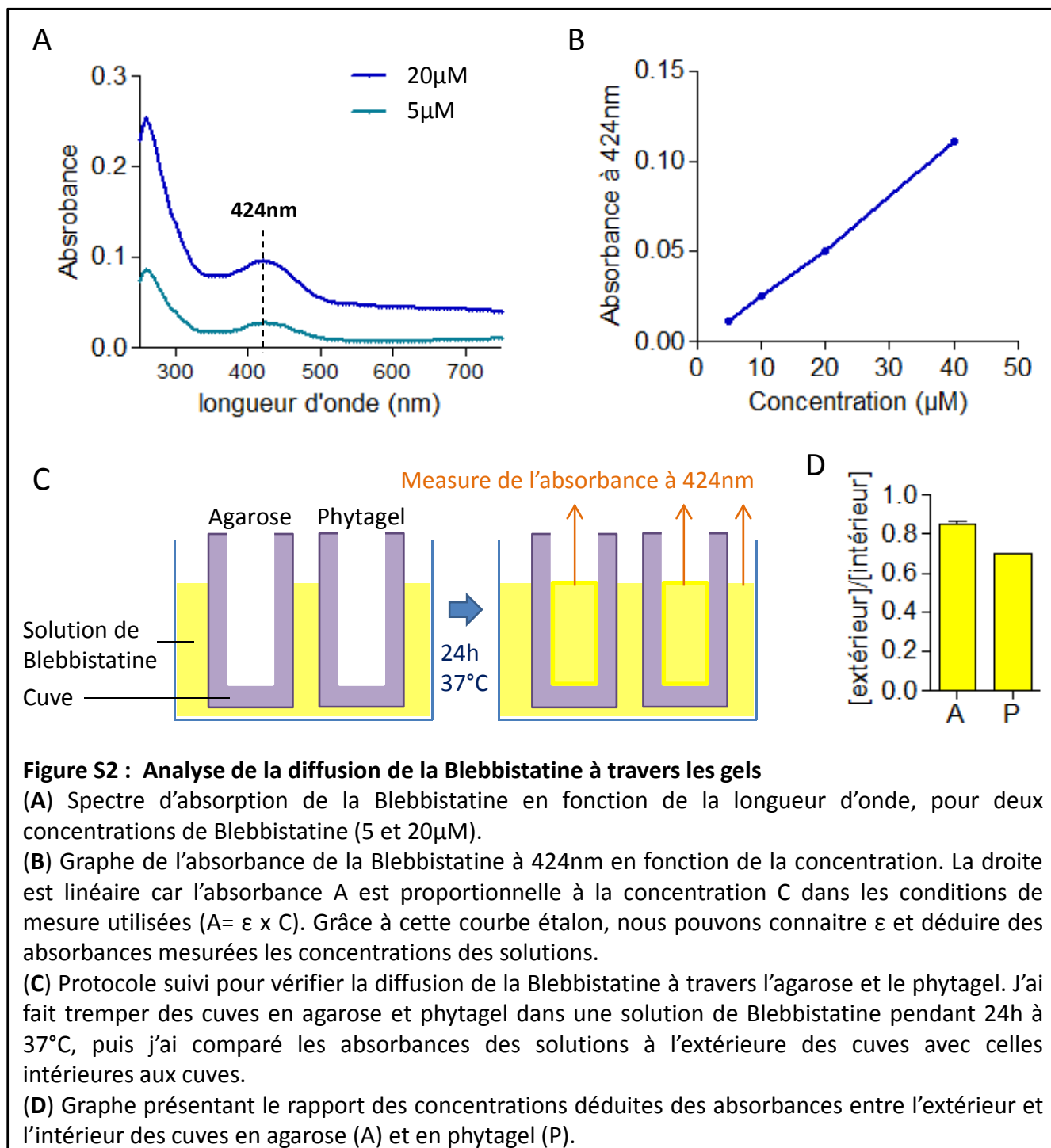
FIGURES ANNEXES

Figure S1 : Arrondissement des cellules mitotiques

(A) Image prise au microscope biphotonique d'une coupe à congélation d'un sphéroïde contraint dont les jonctions intercellulaires (E-Cadhérine, vert), l'ADN (DAPI, bleu) et la cellule mitotique (H3P, rouge) ont été marqués. Le tracé du contour cellulaire d'après ce type d'images permet d'extraire l'aire et la circularité des cellules mitotiques.

(B) Graphes représentant les aires (gauche) et les circularités (droite) des cellules mitotiques des sphéroïdes contrôle (bleu) et des sphéroïdes contraints (agarose, rouge), mesurées d'après des images telles que celle présentée en (A).





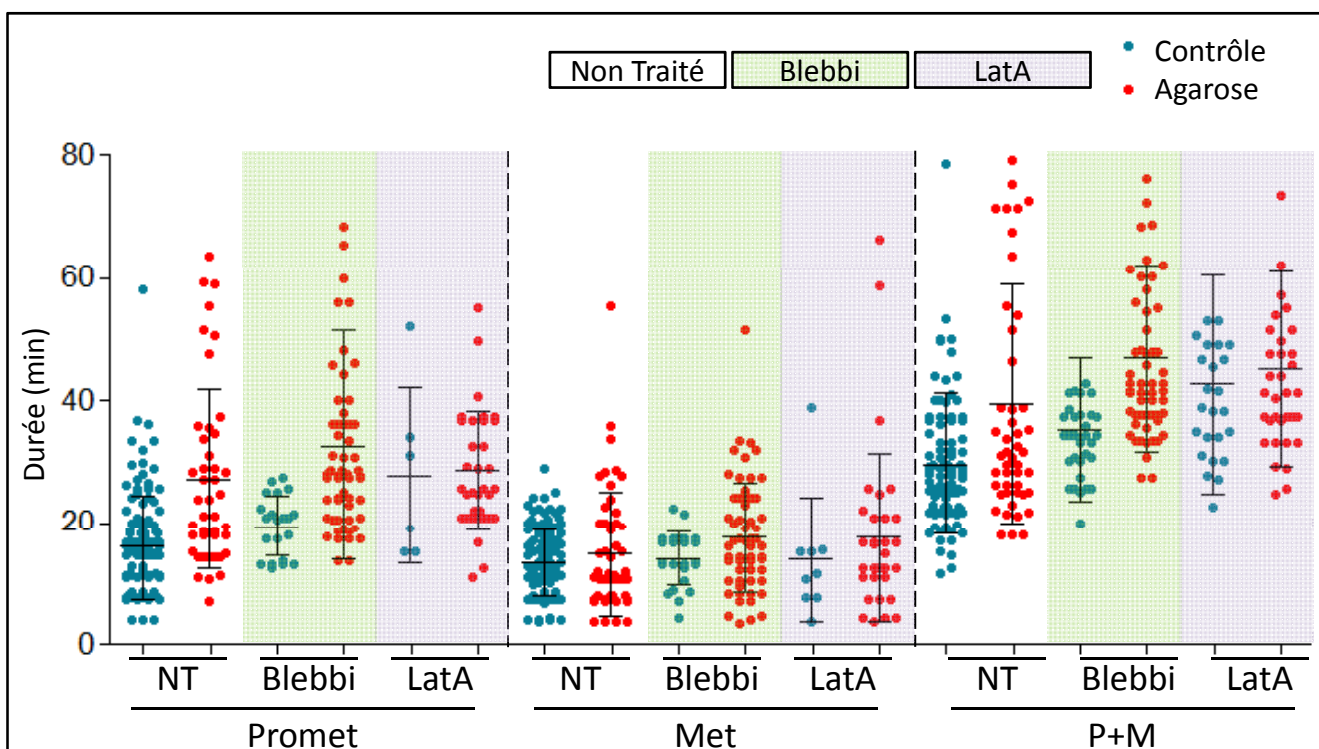
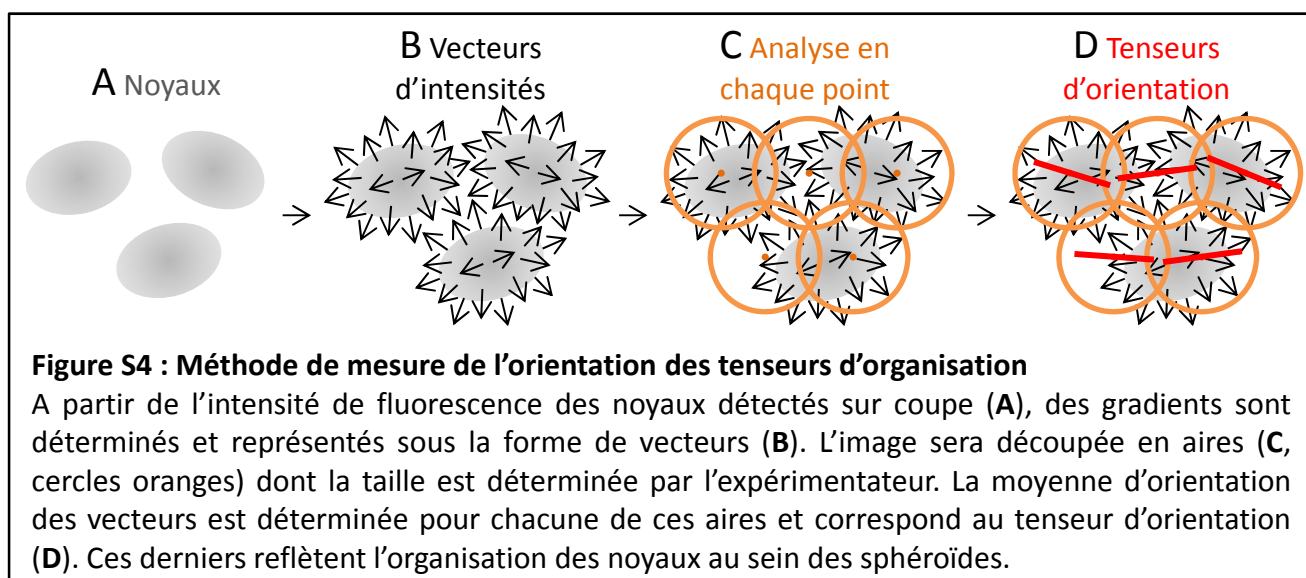


Figure S3 : Durée des étapes de la mitoses pour toutes les conditions de croissance des sphéroïdes

Graphique représentant les durées (+/- déviation standard) de la prométaphase (Promet), de la métaphase (Met) et de la prométaphase et métaphase cumulées (P+M) pour les mitoses des sphéroïdes contrôles (bleu) ou contraints (rouge) qu'ils soient non traités (NT, fond blanc) ou traités avec la Blebbistatine (Blebbi, fond vert) ou avec la Latrunculine A (LatA, fond violet). Chaque point représente une mitose.



ABREVIATIONS

2D : 2 dimensions

3D : 3 dimensions

AFM : Atomic Force Microscopy

APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome

ATP : Adenosine-5'-triphosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related protein

Blebbs : Blebbistatine

Bub1/3 : Budding Uninhibited by Benzimidazoles

BubR1 : Bub-related kinase-1

C : Central Area

Cdc20 : Cell Division Cycle 20

Cdk2 : Cyclin-dependent Kinase 2

CENP-E : Centromere-associated protein E

Chfr : Checkpoint with FHA and Ring finger domain

CTL : contrôle

DMEM : Dubelco's Modified Eagle's Medium

ECM : Extracellulaire Matrix

EdU : 5-ethynyl-29-deoxyuridine

FAK : Focal Adhesion Kinase

FDA : Food and Drug Administration

Fucci : Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator

H3P : Histone 3 Phosphorylée

KLP3A : Kinesin-Like-Protein-at-3A

LatA : Latrunculine A

LATS : Large Tumor Suppressor protein

LOX : Lysyl Oxydase

Mad 1/2 : Mitotic Arrest Deficient

MAPK : mitogen-activated proteins kinases

MCAK : Mitotic Centromere-Associated Kinesin

MCC : Mitotic Checkpoint Complex

MCTS : MultiCellular Tumor Spheroids

MEC : Matrice Extracellulaire
Met : Métaphase
NRK : Normal Rat kidney Epithelial cells
NT : Non traité
P : Peripheral area
P+M : Prométaphase et Métaphase cumulées
Pa : Pascal
PARP-C : Poly ADP-Ribose Polymerase -Clivée
PDMS : Polydiméthylsiloxane
pH3 : Phosphorylated Histon 3
PolyHema : Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)
Promet : Prométaphase
R_{cc} : Rapport “Contraint sur Contrôle”
ROCK : Rho-associated protein kinase
RPE1 : Retinal Pigment Epithelial cell line
RSV : Rous Sarcoma Virus
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SPIM : Single Plane Illumination Microscopy
Src : Sarcoma
VHL : Von Hippel–Lindau
YAP : Yes-associated protein

Impact of mechanical stress on cell division: study in a multicellular tumor spheroid model

Annaïck DESMAISON

A tumor micro-region consists of a heterogeneous cancer cell population organized in a 3D structure in which cell growth is influenced by interaction with the microenvironment. Changes in mechanical homeostasis within tissues are observed during tumor growth, leading to high pressure and tension forces within the growing tumor. Those changes in mechanical properties of the microenvironment participate to tumor development by influencing, amongst others, proliferation and migration of tumor cells. One important aspect of the control of proliferation is the regulation of the cell cycle. Many studies have demonstrated that mitosis progression, the division process of cell cycle, is not only biochemically regulated, but also mechanically regulated. However, the impact of mechanical cues on mitotic progression has essentially been documented using 2D monolayer-based models and very little is known about the consequences of mechanical stress on cell division within tumors.

In this context, my goal was to investigate the impact of mechanical stress on cell division in MultiCellular Tumor Spheroids (MCTS), an *in vitro* model that mimics 3D cell organization and heterogeneity found in tumor microregions *in vivo*.

We first induced mechanical stress on MCTS by restricting their growth in a confined environment. We demonstrated that mechanical stress impairs cell division. The study of the dynamics of mitosis progression within MCTS mechanically constrained in agarose, showed that mechanical stress induces a delay in prometaphase. This delay may be due to a transient defect in spindle assembly, and possibly implies actin filament dynamics. This defect in spindle assembly does not seem to induce a preferential orientation deviation of the division axis of cells within spheroids. Furthermore, we showed that in this mechanical stressed condition, drugs destabilizing the actomyosin cytoskeleton do not alter mitosis anymore, suggesting that signaling pathways could be activated and avoid aberrant mitosis progression.

Altogether these results suggest that mechanical stress induced by progressive confinement of growing spheroid could slow down mitotic progression. However, a defect in mitosis progression could lead to chromosomes missegregation, responsible for increased genomic instability and cellular heterogeneity. This genetic heterogeneity characteristic of tumors is one of the major reasons for the limited efficiency of current therapeutic strategies. Mechanical stress might also induce the activation of specific pathways able to bypass the effect of certain drugs. This study paves the way for future research to a better understanding of the tumor cell response to mechanical cues similar to those encountered during *in vivo* tumor development. It could contribute to defining important characteristics of mechanical parameters of tumor on drug efficiency and open new perspectives in anti-tumor therapy.

Impact des contraintes mécaniques sur la division cellulaire : Analyse dans un modèle tumoral multicellulaire en 3 dimensions : le sphéroïde

Annaïck DESMAISON

Directeurs de thèse : Ducommun Bernard et Lobjois Valérie

Une tumeur est une structure hautement organisée en 3D, intégrant des relations entre les cellules et avec son environnement. Le remodelage de l'environnement par la tumeur et sa croissance dans un environnement restreint induisent un déséquilibre de l'homéostasie tissulaire et l'accumulation d'un stress mécanique au niveau de la tumeur. Il a été montré que ce stress mécanique est un paramètre important du développement tumoral qui influence, entre autre, la migration et la prolifération des cellules tumorales. Un des aspects majeurs du contrôle de la prolifération cellulaire est la régulation du cycle cellulaire. De nombreuses études montrent que le déroulement de la mitose, étape de division du cycle cellulaire, est régulée par les propriétés mécaniques de l'environnement cellulaire. Cependant, l'impact des contraintes mécaniques sur la progression en mitose a essentiellement été étudié sur des modèles de culture en monocouche et les conséquences induites sur le développement tumoral sont encore méconnues.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux est d'étudier l'impact des contraintes mécaniques sur la division cellulaire, dans un modèle tumoral multicellulaire 3D, le sphéroïde. Ce modèle mime l'organisation multicellulaire et l'hétérogénéité cellulaire telles qu'elles existent in vivo dans des microrégions tumorales.

Afin de mimer un environnement confiné, des microdispositifs ont été fabriqués pour restreindre la croissance et contraindre mécaniquement les sphéroïdes. Ces conditions expérimentales nous ont permis de démontrer que la contrainte mécanique altère la division des cellules au sein des sphéroïdes. L'étude de la dynamique de progression en mitose de sphéroïdes contraints dans un dispositif en agarose adapté à l'imagerie en temps réel, a révélé un délai en prométaphase induit par la contrainte mécanique, probablement dû à un défaut transitoire de mise en place du fuseau bipolaire et impliquant le cytosquelette d'actomyosine. Ce défaut ne semble pas induire un défaut d'orientation préférentiel de l'axe de division observé dans les sphéroïdes. De plus, ces résultats montrent qu'en condition de croissance en présence d'un stress mécanique, des traitements déstabilisant le cytosquelette d'actomyosine n'induisent pas d'altération de la mitose, suggérant que des voies de signalisation permettant d'éviter les erreurs de progression en mitose soient activées.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la contrainte mécanique induite par la croissance progressive des sphéroïdes dans un environnement confiné ralentit la progression en mitose. Ce ralentissement peut être responsable d'erreurs de ségrégations des chromosomes induisant une augmentation de l'instabilité génétique et une hétérogénéité cellulaire. Cette hétérogénéité est caractéristique des tumeurs et souvent responsable de l'efficacité limitée des stratégies thérapeutiques actuelles. Les travaux réalisés viennent enrichir les connaissances de la réponse des cellules tumorales à leur environnement mécanique tel qu'il existe in vivo et ses conséquences sur le développement tumoral. Il permet aussi d'identifier les caractéristiques importantes des paramètres mécaniques à prendre en compte pour définir l'efficacité des traitements, et ouvre de nouvelles perspectives de thérapies antitumorales.

Mots Clés :

Tumeur, Microenvironnement, Prolifération cellulaire, Stress mécanique, Mitose, Sphéroïde

Discipline : ED BSB : Biologie cellulaire

*Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITV)
USR3505, Centre Pierre Potier
1 Place Pierre Potier – BP 50624
31106 Toulouse Cedex 1*